

Aus dem Bereich
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

Etablierung einer auf den Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2015

vorgelegt von: Simone Christina Ernst
geboren am: 23.09.1988 in Püttlingen

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Stöckle

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	4
Summary.....	6
2. Einleitung.....	8
2.1 Das Nierenzellkarzinom	8
2.1.1 Epidemiologie	8
2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	9
2.1.3 Genetische Prädisposition	9
2.1.4 Histopathologische und klinische Einteilung.....	10
2.1.5 Stadieneinteilung	13
2.1.6 Klinik und Diagnostik.....	15
2.1.7 Therapie	16
2.2 Sunitinib	24
2.3 Resistenz gegen Tyrosinkinase-Inhibitoren	25
3. Ziele der Arbeit	27
4. Material und Methoden	28
4.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	28
4.2 Chemikalien	29
4.3 Zellkultur	29
4.3.1 Inspektion der Zellen.....	29
4.3.2 Passagieren der Zellen	30
4.3.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	31
4.3.4 Besetzen einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit Zellen zur Durchführung eines Assays	32
4.3.5 Passagieren von Zellen der Langzeitkultur CAKI-2 +/- Sunitinib	32
4.3.6 Besetzen einer 96-Well-Mikrotiterplatte aus der Langzeitkultur CAKI-2 +/- Sunitinib.....	33
4.4 Assays	33
4.4.1 Viability Assay mit dem Cell Proliferation Reagent WST-1	33
4.4.2 Cell Proliferation Kit II (XTT)	34
4.4.3 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric immunoassay)	35
4.4.4 Cytotoxicity Detection Kit LDH (Plus) (colorimetric assay).....	35
4.4.5 Cell Death Detection ELISA Plus	37

5. Ergebnisse	39
5.1 Analyse des antiproliferativen Effektes von Sunitinib auf vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien und Definition des IC ₅₀ -Wertes	39
5.1.1 Antiproliferativer Effekt von Sunitinib auf 786-O und IC ₅₀ -Wert	39
5.1.2 Antiproliferativer Effekt von Sunitinib auf A-498 und IC ₅₀ -Wert	43
5.1.3 Antiproliferativer Effekt von Sunitinib auf CAKI-1 und IC ₅₀ -Wert	46
5.1.4 Antiproliferativer Effekt von Sunitinib auf CAKI-2 und IC ₅₀ -Wert	49
5.1.5 Durchführung des Cytotoxicity Detection LDH Plus Assays, des Cell Death Detection ELISA Plus Assays und des Cell Proliferation ELISA Assays (BrdU)	53
5.2 Etablierung einer auf Sunitinib resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie	59
5.3 Charakterisierung von zellbiologischen Parametern unter der Therapie	60
5.3.1 Start der Langzeitkultur, Passage 25-30	60
5.3.2 Passage 31-35	63
5.3.3 Passage 36-41	67
6. Diskussion	76
6.1 Analyse des antiproliferativen Effektes von Sunitinib auf vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien und Definition des IC ₅₀ -Wertes	76
6.2 Analyse des direkten zytotoxischen Effektes von Sunitinib auf Tumorzellen	77
6.2.1 Cytotoxicity Detection LDH plus Assay	78
6.2.2 Cell Death Detection ELISA plus Assay	79
6.2.3 Cell Proliferation ELISA (BrdU)	80
6.3 Etablierung einer auf Sunitinib resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie	81
6.4 Charakterisierung von zellbiologischen Parametern unter der Therapie	83
6.5 Sunitinib- Resistenz	86
6.5.1 Extrinsische Resistenz	86
6.5.2 Intrinsische Resistenz	88
6.5.3 Diskrepanz zwischen Forschung und klinischem Alltag	88
6.5.4 Umgang mit Resistenz im klinischen Alltag	88
6.5.5 Relevanz von Biomarkern	91
6.6 Schlussfolgerungen und Ausblick	93
7. Literaturverzeichnis	95
8. Publikationsverzeichnis/ Danksagung	107
9. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Zusammenfassung

Bösartige Neubildungen der Niere gehören zu den dritthäufigsten urologischen Tumoren. Da Nierenzellkarzinome so gut wie keine Frühsymptome verursachen, werden sie meist als Zufallsbefund bei Ultraschalluntersuchungen entdeckt. Bei 15-20 Prozent der Patienten sind bereits bei Diagnosestellung Metastasen nachzuweisen, weitere 20 bis 30 Prozent entwickeln metachron Metastasen. Da das Nierenzellkarzinom kaum auf Strahlen- oder konventionelle Chemotherapie anspricht, ist die Prognose von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden als sehr schlecht einzustufen. In den letzten Jahren konnte jedoch durch die Entwicklung sogenannter „Targeted-Therapeutika“, zum Beispiel Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Sunitinib, die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms verbessert und somit den Betroffenen ein längeres Überleben ermöglicht werden. Diese Therapeutika wirken antiangiogenetisch, haben aber auch einen direkten zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen. Initial sprechen 65 Prozent der Behandelten auf die Therapie mit Sunitinib oder auch anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren an. Leider entwickeln nahezu alle Patienten im Laufe der Behandlung Resistenzen gegen das Pharmakon, sodass es zu einem Tumorprogress kommt. Die zugrundeliegenden Resistenzmechanismen sind bis heute nur unvollständig verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, eine gegen den Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib resistente Nierenzellkarzinom-Zelllinie zu etablieren.

In einem ersten Schritt wurden hierzu mittels Viability Assay WST-1 die IC_{50} -Werte für vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien (786-O, A-498, CAKI-1 und CAKI-2) unter fünftägiger Sunitinib-Behandlung definiert. Um den direkten Wirkmechanismus von Sunitinib auf die Tumorzellen zu analysieren, wurden anschließend an drei ausgewählten Zelllinien ein Assay zu Detektion von Nekrose (Cytotoxicity Detection LDH plus) bzw. Apoptose (Cell Death Detection ELISA plus) sowie ein Proliferationsassay (Cell Proliferation ELISA BrdU) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor an den Karzinomzellen am ehesten über eine Hemmung der Proliferation wirkt.

Zur Langzeitkultivierung mit Sunitinib wurde die Zelllinie CAKI-2 ausgewählt. Die Zellen wurden in zwei Arme aufgeteilt. Die Zellen des Kontrollarms wurden nur während der Durchführung von Assays zu bestimmten Zeitpunkten mit dem

Tyrosinkinase-Inhibitor behandelt. Der zweite Arm war einer permanenten Behandlung mit Sunitinib in der Konzentration 5 μ M ausgesetzt. Die Dosis lag hierbei etwas unterhalb des zuvor ermittelten IC₅₀-Wertes für diese Zelllinie. Zu definierten Zeitpunkten wurden Viability- sowie Proliferationsassays durchgeführt, um ein Monitoring der Resistenzentwicklung zu ermöglichen. Die Zellen wurden wöchentlich gezählt.

Nach 16 Passagen der Langzeitkultivierung war es gelungen, eine gegen Sunitinib resistente CAKI-2-Zelllinie zu etablieren. Die Resistenz manifestierte sich zunächst in einer Umgehung der Sunitinib-induzierten Proliferationshemmung. Später konnte auch eine gesteigerte Viability festgestellt werden. Die Zellzahl der dauerbehandelten Zellen lag bis zur Beendigung der Sunitinib-Dauerbehandlung unter der der unbehandelten Kontrollzellen.

Die etablierte Sunitinib-resistente CAKI-2-Zelllinie kann zukünftig sowohl zur Untersuchung zugrundeliegender Resistenzmechanismen als auch zur Entdeckung von Strategien zur Umgehung von Resistenz verwendet werden. Die Sequenzbehandlung der Zelllinie mit anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren oder mTOR-Inhibitoren können helfen, eine möglichst optimale Sequenzfolge zu definieren, die auch im klinischen Alltag anwendbar ist und so entscheidend dazu beiträgt, dass Resistenzentwicklungen in naher Zukunft vermieden oder zumindest verzögert werden können.

Summary

Establishment of a Sunitinib-resistant renal cell carcinoma cell line

Malignant neoplasms of the kidney are the third most common urological tumors. Since renal cell carcinomas cause virtually no early symptoms, they are usually discovered as an incidental finding at ultrasound examinations. In 15-20 percent of patients metastases are already found at diagnosis, an additional 20 to 30 percent develop metachronous metastases. Since the renal cell carcinoma is less sensitive to radiation or conventional chemotherapy, the prognosis of patients with advanced tumor disease was classified as very poor. In recent years, however, after the development of so called "targeted therapeutics" like tyrosine kinase inhibitors such as Sunitinib, the treatment of metastatic renal cell carcinoma has been improved and thus the survival of patients has significantly extended. These drugs act anti-angiogenetically, but also have a direct cytotoxic effect on the tumor cells. Initially, 65 percent of the patients respond to the therapy with Sunitinib or other tyrosine kinase inhibitors. Unfortunately, nearly all patients will develop resistance to the drug during treatment, leading to tumor progression. The underlying mechanisms of resistance are only poorly understood.

The aim of this study was the establishment of a Sunitinib-resistant renal cell carcinoma cell line.

In a first step, IC_{50} values have been defined for the four renal cell carcinoma cell lines (786-O, A-498, CAKI-1 und CAKI-2) after a Sunitinib treatment of five days.

To learn more about the direct mechanism of action on tumor cells, further assays were performed: one assay to detect necrosis (Cytotoxicity Detection LDH plus), one to detect apoptosis (Cell Death Detection ELISA plus) and one to detect proliferation (Cell Proliferation ELISA BrdU). It was found that the tyrosine kinase inhibitor acts on the carcinoma cells most likely via inhibition of proliferation.

For long-term cultivation with Sunitinib the cell line CAKI - 2 was selected. The cells were divided into two arms. The cells in the control arm were only treated with the tyrosine kinase inhibitor during the performance of viability or proliferation assay at specific time points. The cells in the second arm were exposed to a permanent

treatment with Sunitinib in the concentration 5 μ M. This dose was slightly below the previously determined IC₅₀ value. At defined time points viability and proliferation assays were performed to allow the monitoring of the development of resistance. The cells were counted weekly.

After 16 passages of the long-term cultivation, we have succeeded to establish a CAKI-2 cell line resistant to Sunitinib. The resistance initially manifested in circumvention of Sunitinib -induced inhibition of proliferation. Later it was also possible to determine an increased viability compared to the untreated control. The cell number of the permanent treated cells was still lower compared to the untreated control until the end of the long term treatment.

The newly established Sunitinib-resistant CAKI-2 cell line could be used to investigate underlying mechanisms of resistance as well as to discover strategies to circumvent resistance. Sequential treatment of the cell line with other tyrosine kinase inhibitors or mTOR inhibitors may help to define an optimal sequence which is also applicable in clinical practice and so in the near future the development of resistance could be avoided or at least delayed.

2. Einleitung

2.1 Das Nierenzellkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Bösartige Neubildungen der Niere liegen auf Platz 13 der weltweit häufigsten Krebserkrankungen und auf Platz drei der häufigsten urologischen Tumorleiden (nach Prostata- und Harnblasenkarzinom). Damit handelt es sich um eine eher seltene Tumorentität. Die Inzidenz ist hierbei in den Industrienationen höher als in Entwicklungsländern und steigt mit zunehmendem Alter kontinuierlich an [Chow, Devesa 2008; Ljungberg et al. 2011]. In Deutschland rangieren die Malignome der Niere auf Platz 8 (Männer) bzw. Platz 10 (Frauen) der häufigsten Krebserkrankungen [Robert Koch Institut 2013].

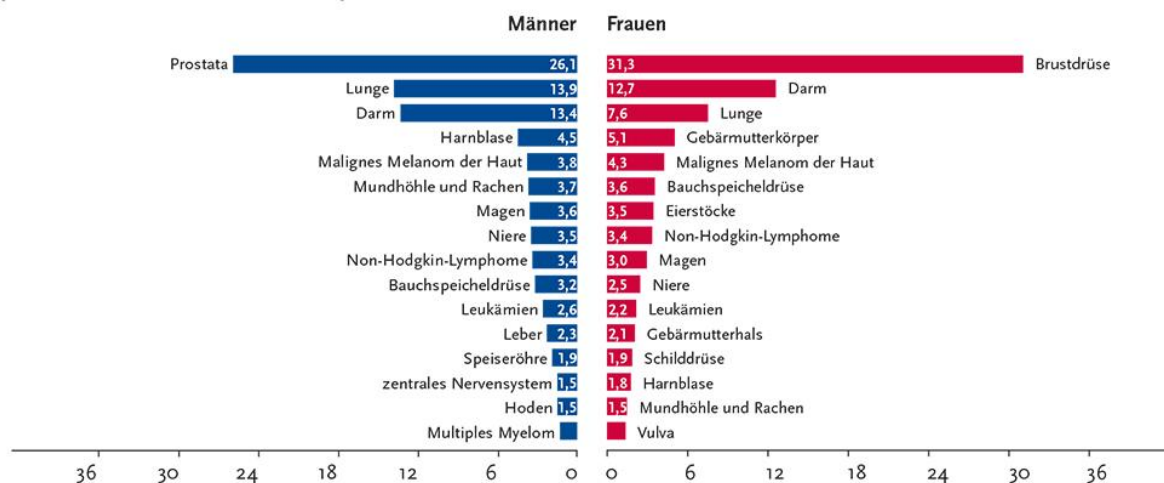


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen bei Männern und Frauen in Deutschland im Jahr 2010 [Robert Koch Institut 2013]

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste Nierentumor und repräsentiert dabei annähernd 90% aller Malignome der Niere [National Comprehensive Cancer Network (NCCN): Kidney Cancer 2009]. Es erkranken fast doppelt so häufig Männer wie Frauen am Nierenzellkarzinom [Ferlay et al. 2010].

2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Karzinogenese des Nierenzellkarzinoms ist im Wesentlichen noch nicht verstanden [Gupta et al. 2008]. Es wurden jedoch verschiedene Risikofaktoren identifiziert, die in Zusammenhang mit dem Auftreten von Nierenzellkarzinomen stehen. Hierzu gehören sog. „Lifestyle-Faktoren“ wie Nikotinabusus, deutliches Übergewicht bzw. Fettleibigkeit sowie eine fettreiche und faserarme Ernährung [Hu et al. 2008, McLaughlin et al. 1995, Mellemgaard et al. 1995, Shapiro et al. 1999]. Auch die (berufliche) Exposition gegenüber Asbest, Cadmium, Trockenreinigungsmitteln oder Petroleumprodukten erhöht das Erkrankungsrisiko [Mandel et al. 1995]. Zu den weiteren Risikofaktoren gehören die arterielle Hypertonie, Analgetika [Gago-Dominguez et al. 1999] sowie die chronische Niereninsuffizienz mit Hämodialysepflichtigkeit [Denton et al. 2002].

2.1.3 Genetische Prädisposition

Das Nierenzellkarzinom tritt in den meisten Fällen sporadisch auf. Es sind aber auch verschiedene familiäre und genetische Prädispositionen bekannt. Die hierbei häufigste Form ist das von-Hippel-Lindau-Syndrom, welches einem autosomal-dominantem Erbgang folgt und bei etwa einem von annähernd 36000 Lebendgeborenen auftritt. Das 1993 identifizierte von-Hippel-Lindau-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p25) [Latif et al. 1993]. Betroffene Patienten haben bereits im jungen Lebensalter ein hohes Risiko für klarzellige Nierenzellkarzinome, die häufig auch multifokal oder bilateral auftreten können [Chaveau et al. 1996]. Weiterhin zeigt sich ein erhöhtes Vorkommen von retinalen und zerebellären Hämangioblastomen, Phäochromozytomen sowie Nieren-, Pankreas- und Nebenhodenzysten bei Trägern von Mutationen des von-Hippel-Lindau-Gens (VHL-Gens) [Motzer et al. 1996]. Bei nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomen kommt eine Mutation des Gens nicht vor [Linehan et al. 2004]. Auch bei der tuberösen Sklerose, einer ebenfalls autosomal-dominant vererbten Krankheit, ist bei den Betroffenen mit einem häufigeren Auftreten von Nierenzellkarzinomen zu rechnen [Bjornsson et al. 1996]. Es kann auch eine familiäre Häufung von Nierenzellkarzinomen auftreten, die nicht mit einem Syndrom vergesellschaftet ist. Bei dieser Gruppe treten die Tumore in einem früheren Lebensalter auf, als das bei sporadisch aufgetretenen Tumoren der Fall wäre [Negri

et. al 2006]. Inzwischen sind weitere vererbare Nierenzellkarzinome bekannt, die alle einem autosomal-dominantem Erbgang folgen. Beispiele hierfür sind das erbliche papilläre Nierenzellkarzinom, das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom sowie die hereditäre Leiomyomatose [Verine et al. 2010].

2.1.4 Histopathologische und klinische Einteilung

Subtypen der Nierentumore

Bei der überwiegenden Mehrheit (etwa 90%) der in der Niere auftretenden Malignome handelt es sich um epitheliale Neoplasien des Nierenparenchyms. Die restlichen 10% umfassen Plattenepithel- und Urothelkarzinome sowie Sarkome. Zu den benignen Nierenzelltumoren zählen vor allem papilläre Adenome und Onkozytome. Die aktuelle Einteilung epithelialer Neoplasien der Niere erfolgt durch die WHO-Klassifikation von 2004. Sie berücksichtigt morphologische, genetische und prognostische Unterschiede. Aufgrund einer Vielzahl an neu beschriebenen Tumorentitäten wurde diese 2009 erweitert und aktualisiert [Lopez-Beltran et al. 2006, 2009]. In der Vergangenheit hatte sich die genaue histopathologische Klassifikation als sehr wertvoll im klinischen Management renaler Neoplasien erwiesen [Kirkali et al. 2007]. In den letzten Jahren jedoch führte die Erforschung neuer molekularer und zytogenetischer Marker zur Entdeckung und Klassifikation diverser neuer Subtypen von Neubildungen der Niere [Cheng et al. 2009]. Zu den häufigsten malignen Tumoren der Nieren gehören das klarzellige Nierenzellkarzinom, das papilläre Nierenzellkarzinom, das chromophobe Nierenzellkarzinom sowie das Sammelrohr-oder Duct-Bellini-Karzinom.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Nierenzellkarzinome und ihre Häufigkeiten [Eble et al. 2004]

Nierenzellkarzinom-Subtyp	Häufigkeit
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	75%
Papilläres Nierenzellkarzinom	15%
Chromophobes Nierenzellkarzinom	5%
Duct-Bellini-Karzinom (=Sammelrohrkarzinom)	<1%
Multilokulär-zystisches Nierenzellkarzinom	<1%

Nierenmarkkarzinom	Sehr selten
Nierenzellkarzinom in Assoziation mit Xp11-Translokation	<1%
Muzinös-tubuläres und spindelzelliges Karzinom	<1%
Nierenzellkarzinom assoziiert mit Neuroblastom	Extrem selten
Unklassifizierte Nierenzellkarzinome	4-5 %

Klarzelliges Nierenzellkarzinom

Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit einem Anteil von 70-75 % die häufigste maligne Neubildung der Niere bei Erwachsenen [Cheng et al. 2009]. Es entspringt den Zellen des proximalen Tubulussystems [Vogelzang, Stadler 1998] und kann, wenn auch selten, sowohl multilokulär als auch bilateral auftreten [Chaveau et al. 1996]. Makroskopisch präsentiert sich der solide Tumor aufgrund seines Lipidreichtums goldgelb mit nekrotischen, zystisch degenerierten, hämorrhagischen, kalzifizierten oder ossifizierten Anteilen [Eble et al. 2004]. Mikroskopisch imponieren die Tumorzellen typischerweise farblos, da sich während der histologischen Aufarbeitung Lipide und das zytoplasmatische Glykogen herauslösen. Verglichen zu den anderen häufiger auftretenden malignen Nierentumoren hat das klarzellige Nierenzellkarzinom aufgrund seiner hohen Metastasierungsrate eine schlechte Prognose [Cheville et al. 2003].

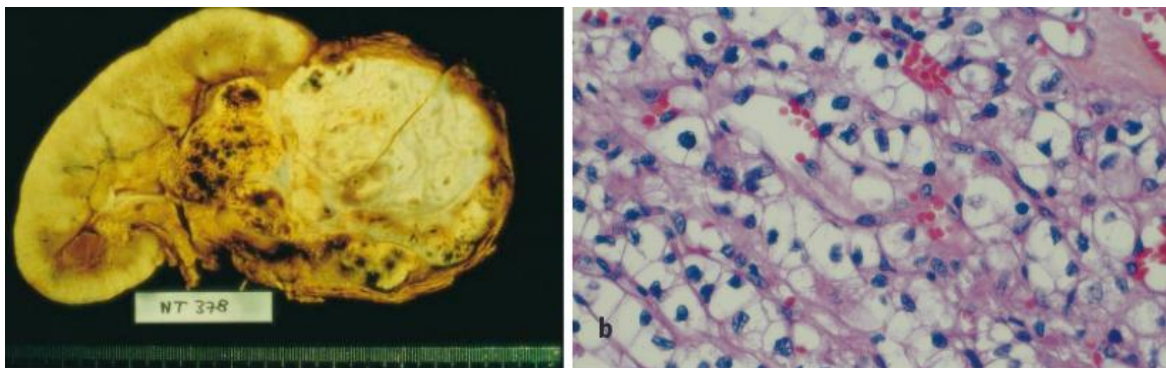


Abbildung 2: Makroskopische und mikroskopische Aspekte des klarzelligen Nierenzellkarzinoms; linkes Bild: Schnitt durch ein Nephrektomie-Präparat, Tumor rechtsseitig mit typischer gelber Schnittfläche; rechtes Bild: Histologie des klarzelligen Nierenzellkarzinom in HE-Färbung [Störkel 1999]

Papilläres Nierenzellkarzinom

Das papilläre (oder auch chromophile) Nierenzellkarzinom ist mit einer Häufigkeit von etwa 15% das am zweithäufigsten auftretende Nierenzellkarzinom [Shen et al. 2007]. Auch dieser maligne Nierentumor nimmt seinen Ausgang von den Zellen des proximalen Tubulusepithels [Vogelzang et al. 1998]. Delahunt und Eble teilten die papillären Nierenzellkarzinome in zwei Untergruppen ein.

Beim PRCC Typ 1 zeigen die würfelförmigen Zellen entlang der papillären Kerne blasses oder basophiles Zytoplasma. Regelmäßig werden auch Psammomkörper und schaumige Makrophagen beobachtet. Die papillären Typ-1-Tumoren haben eine gute Prognose.

Die papillären Tumore vom Typ 2 bestehen aus großen eosinophilen Zellen mit großen Zellkernen und oft prominenten Nukleoli. Die histologische Architektur ist mehr oder weniger papillär ausgeprägt mit einigen tubulären oder kompakten Zellanordnungsmustern. Psammomkörper oder schaumige Makrophagen kommen nicht vor [Delahunt, Eble 1997]. Diese Tumoren haben im Vergleich zu den papillären Tumoren vom Typ 1 eine schlechtere Prognose [Allory et al. 2003].

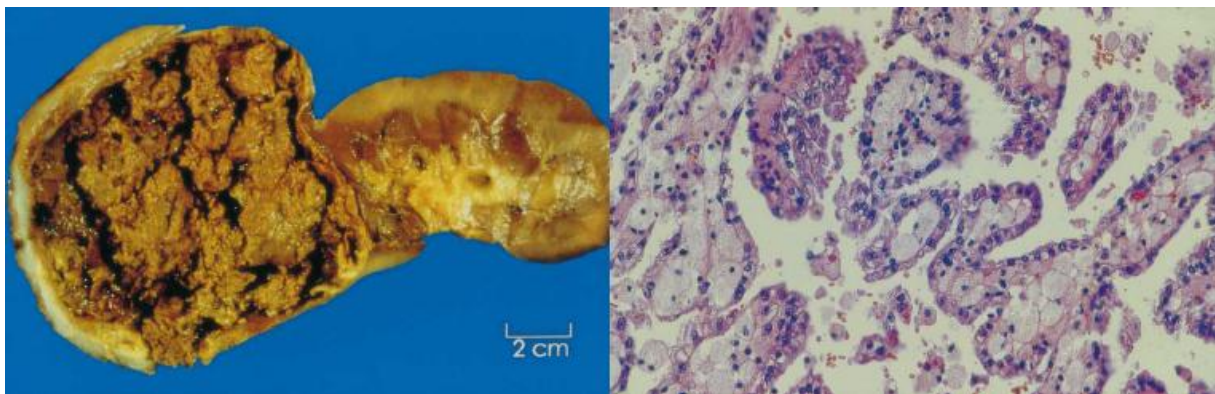


Abbildung 3: Makroskopische und mikroskopische Aspekte des papillären Nierenzellkarzinoms; linkes Bild: Nephrektomie-Präparat, linksseitig großer brauner Tumor mit krümeliger Schnittfläche; rechtes Bild: Histologie des papillären Nierenzellkarzinoms in HE-Färbung [Störkel 1999]

Chromophobes Nierenzellkarzinom

Das chromophobe Nierenzellkarzinom repräsentiert etwa 4-6% der malignen renalen Neoplasien und entspringt den Schaltzellen des kortikalen Sammelrohres [Motzer et al. 1996]. Makroskopisch imponiert diese Art von Tumor hellbraun, nur selten werden

Nekrosen oder hämorrhagische Areale beobachtet. Histologisch dominierend ist die solide Zellarchitektur. Chromophobe Zellen sind variabel groß und vielflächig, mit reichlich blassem oder eosinophilem Zytoplasma. Die Tumorzellkerne sind stark gewinkelt, es zeigt sich ein perinukleärer Halo. Die zytoplasmatische Membran stellt sich aufgrund einer peripheren Zytoplasmakondensation prominent dar. Die ausgeprägte Positivität (Blaufärbung) in der kolloidalen Eisenreaktion nach Hale ist ein Schlüsselkriterium zur Diagnose [Kuroda et al. 2003], da das chromophobe Nierenzellkarzinom in der Routinehistologie leicht mit dem klarzelligen Nierenzellkarzinom verwechselt werden kann.

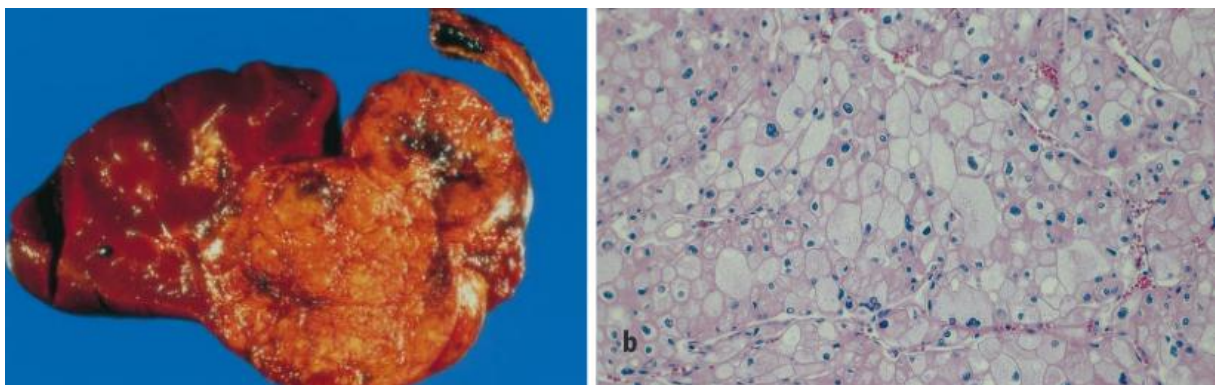


Abbildung 4: Makroskopische und mikroskopische Aspekte des chromophoben Nierenzellkarzinoms; linkes Bild: Nephrektomie-Präparat mit rechtsseitigem orange-hellbräunlichem Tumor; rechtes Bild: Histologie des chromophoben Nierenzellkarzinoms in HE-Färbung [Störkel 1999]

2.1.5 Stadieneinteilung

Das *Tumour, Node and Metastasis* (TNM) *Staging System* wurde von der „Union internationale contre le cancer“ (UICC) und dem „American Joint Committee on Cancer“ (AJCC) zur Klassifizierung maligner Tumoren vorgeschlagen und erstmals 1985 angewandt. Es wird kontinuierlich nach neuesten Erkenntnissen überarbeitet. Die letzte Aktualisierung erfolgte 2010, zurzeit wird mit der 7. Auflage gearbeitet [Edge et al. 2010]. Es werden drei Kategorien berücksichtigt: Das T-Stadium dient der Beurteilung der Größe sowie der Ausdehnung des Primärtumors, das N-Stadium zeigt einen möglichen Lymphknotenbefall und das M-Stadium das Auftreten von Fernmetastasen.

Tabelle 2: TNM-Klassifikation maligner Nierentumoren, 7.Auflage (2010)

T-Stadium des Primärtumors	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumorgröße 7cm oder kleiner, auf die Niere begrenzt
T1a	Tumor 4cm oder kleiner in seiner größten Ausdehnung
T1b	Tumor größer als 4 cm, aber kleiner als 7cm in seiner größten Ausdehnung
T2	Tumor größer als 7 cm, auf die Niere begrenzt
T2a	Tumor größer als 7 cm, aber kleiner als 10 cm in seiner größten Ausdehnung
T2b	Tumor größer als 10 cm in seiner größten Ausdehnung
T3	Tumor infiltriert in größere Venen, in die Nebenniere oder ins perirenale Fettgewebe
T3a	Tumor infiltriert in die Nierenvene und perirenal, jedoch nicht über Gerota-Faszie hinaus
T3b	Tumor infiltriert makroskopisch in die V.cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor infiltriert makroskopisch in die V.cava oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
N-Stadium: regionäre Lymphknoten	
Nx	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem Lymphknoten
N2	Metastase in mehr als einem Lymphknoten
M- Stadium: Fernmetastasen	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Zur Beurteilung der regionalen Lymphknoten werden die ipsilateralen hilären Lymphknoten untersucht. Die lymphogene Metastasierung erfolgt in die paraaortalen, parakavalen und interaortokavalen Lymphknoten.

Die hämatogene Metastasierung erfolgt v.a. in die Lunge (31%), seltener in Knochen (15%), Gehirn (8%) oder Leber (5%). Grundsätzlich kann aber jedes Organ betroffen sein [Schmelz, Sparwasser, Weidner 2014]. Die kontralaterale Niere ist in ca. 10%

der Fälle ebenfalls betroffen. Zusätzlich neigt das Nierenzellkarzinom zur Bildung von Tumorthromben. 5-10% der Patienten haben bei Diagnosestellung bereits Thromben in der V. renalis oder der V. cava inferior [Wotkowicz et al. 2008]. Diese können sich bis zum rechten Vorhof ausbreiten.

Durch die genaue Klassifikation eines malignen Tumors kann zum Einen eine Therapieentscheidung getroffen werden, zum Anderen kann auch die Prognose evaluiert werden. Die UICC hat für viele maligne Tumoren, u.a. auch für das Nierenzellkarzinom, eine Stadieneinteilung vorgenommen, die eine Prognoseabschätzung ermöglicht. Hierbei gilt: je höher das UICC-Stadium, desto schlechter ist die Prognose.

Tabelle 3: UICC-Stadien [nach AJCC Cancer Staging Manual]

UICC-Stadium	TNM-Stadium		
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1 oder T2	N1	M0
	T3	N0 oder N1	M0
Stadium IV	T4	N0 oder N1	M0
	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Zur weiteren Abschätzung des Malignitätsgrades wird das Grading-System nach Fuhrman verwendet. Hier werden an HE-gefärbten Präparaten die Kerngröße- und -form, sowie die Prominenz der Nukleoli begutachtet [Fuhrman et al. 1982].

2.1.6 Klinik und Diagnostik

Nierenzellkarzinome verursachen in der Regel keine Frühsymptome. Sie werden heute meist als Zufallsbefund bei einer Sonographie oder anderen bildgebenden Verfahren des Abdomens entdeckt [Porena et al. 1992]. Die typische Trias aus Hämaturie, Flankenschmerzen und tastbarem Tumor tritt nur noch selten auf [Patard et al. 2003]. Das fortgeschrittene Nierenzellkarzinom kann mit weiteren Symptomen einhergehen, z.B. Abgeschlagenheit, Nachtschweiß, (sub-)febrilen Temperaturen, Gewichtsverlust oder Anämie [Motzer et al. 1996]. Auch das Auftreten paraneoplastischer Syndrome ist möglich. Beispiele hierfür sind: Hyperkalziämie (durch Produktion eines Parathormon-ähnlichen Proteins), Hypertonie (durch

verstärkte Renin-Sekretion), Blutbildveränderungen (z.B. Polyzythämie) oder das Stauffer-Syndrom (Erhöhung der Leberenzyme und Verlängerung der Prothrombinzeit) [Bedke et al. 2007]. Bei Diagnosestellung sind bei ca. 30% der Patienten bereits Metastasen nachzuweisen [Abe, Kamai 2013]. Entsprechend der Lokalisation der Metastasen kann es zu weiteren spezifischen Symptomen kommen. Aktuell werden zur Diagnosestellung eines Nierenzellkarzinoms v.a. der Ultraschall, die Computertomographie (CT) oder alternativ (bei Kontraindikationen wie Kontrastmittelunverträglichkeit, Niereninsuffizienz oder Schwangerschaft) die Magnetresonanztomographie (MRT) des Abdomens verwendet. Zum präoperativen Staging wird neben einer Bildgebung des Abdomens zusätzlich eine Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen oder eine Computertomographie des Brustraums durchgeführt [Ljungberg et al. 2010]. Bei klinischem Verdacht auf Metastasen sind ggf. weitere Untersuchungen indiziert, z.B. eine Knochenszintigraphie oder eine Computertomographie des Schädels. Bei Anhalt auf einen Tumorthrombus in der Nierenvene oder in der V. cava inferior kann eine Dopplersonographie hilfreich sein.

2.1.7 Therapie

Bei der Therapie des Nierenzellkarzinoms ist es essentiell, die kurativen von den palliativen Therapieoptionen zu trennen. Außerdem unterscheidet sich die Behandlung der lokalisierten Tumore von der der lokal fortgeschrittenen bzw. metastasierten Nierenzellkarzinome (s. Abbildung 5).

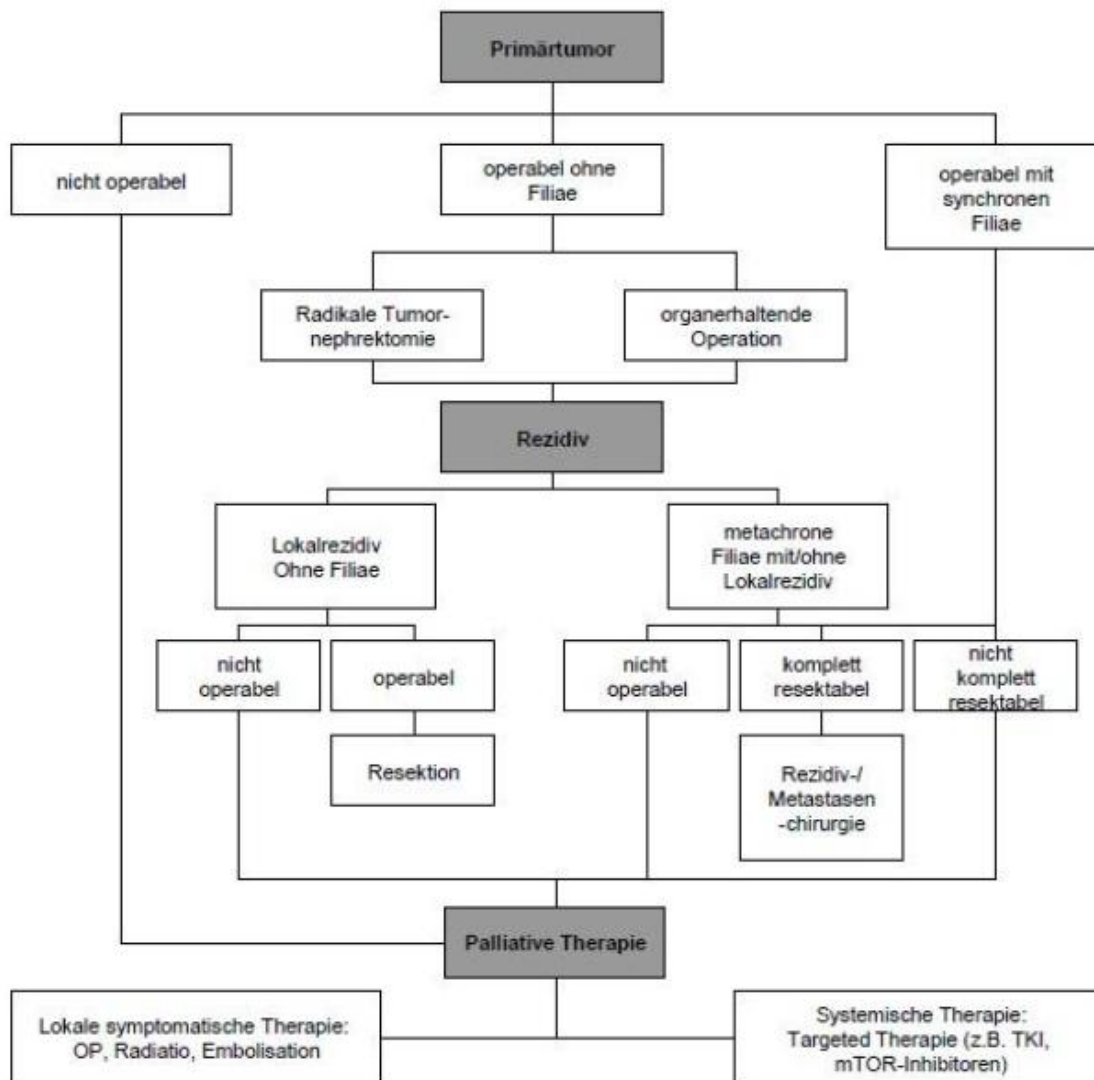


Abbildung 5: Algorithmus für die Therapie des Nierenzellkarzinoms, modifiziert nach Oberneder (TKI= Tyrosinkinase-Inhibitor, mTOR= Mammalian Target Of Rapamycin) [Oberneder et al. 2003]

Operative Therapie

Da das Nierenzellkarzinom weder auf Chemotherapie noch auf Bestrahlung sensibel reagiert, ist die operative Entfernung des Tumors die einzige kurative Therapieoption. Es besteht die Möglichkeit einer Nierenteilresektion oder einer radikalen Tumornephrektomie. Beide Verfahren können sowohl offen-chirurgisch als auch laparoskopisch durchgeführt werden. Bei der Wahl des operativen Verfahrens sind einige Gesichtspunkte zu beachten, u.a. auch Alter und Komorbiditäten des Patienten [Berger et al. 2008]. Die absolute (imperative) Indikation für eine Nierenteilresektion ist eine anatomische oder funktionelle Einnierigkeit des Patienten.

Relative Indikationen sind kleine, peripher lokalisierte Tumore bei gesunder kontralateraler Niere sowie Erkrankungen der kontralateralen Niere, die bei vollständiger Entfernung der tumorerkrankten Niere zu einer Niereninsuffizienz mit eventueller Dialysepflichtigkeit führen würden [Ljungberg et al. 2010]. Bei T1-Tumoren stellt die Nierenteilresektion die Therapie der Wahl dar, auch bei manchen T2-Tumoren ist sie möglich. Eine radikale Nephrektomie ist bei Tumoren mit höherem T-Stadium, ungünstiger Lokalisation oder bereits vorhandener lymphogener Metastasierung zu favorisieren. Die Lymphadenektomie bei in der Bildgebung nicht suspekten Lymphknoten bringt keinen Überlebensvorteil [Blom et al. 2009], wird aber aus Gründen des besseren Stagings im hilären Gebiet durchgeführt. Eine begleitende ipsilaterale Adrenalektomie erfolgt nicht standardmäßig, lediglich bei bildmorphologischem und/oder intraoperativem Verdacht einer Infiltration sollte die Nebenniere reseziert werden [Lane et al. 2009]. Tumorthromben sollten vollständig entfernt werden.

Neben den operativen Verfahren stehen bei kleinen Nierenzellkarzinomen auch eine Reihe von lokalen ablativen Verfahren zur Verfügung, z.B. die Radiofrequenzablation, die Kryoablation oder der Hoch-fokussierte Ultraschall. Aktuell zählen diese allerdings nicht zu den Standardtherapien.

Bei Patienten mit bereits metastasiertem Nierenzellkarzinom sollten, falls möglich, neben der Entfernung des Primärtumors auch die Metastasen komplett entfernt werden, da dies zu einer Verbesserung der Prognose führt [van der Poel et al. 1999].

Systemische Therapie

Im Gegensatz zu den meisten Tumorentitäten spielt die Chemotherapie beim Nierenzellkarzinom keine Rolle [Amato 2000].

Als Standardtherapie war jahrelang die Immuntherapie etabliert. Hierzu wurden Interferon α (IFN- α) sowie Interleukin 2 (IL-2) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass IFN- α einen Vorteil gegenüber nicht-immunbasierten Therapien bringt. In einer Cochrane-Analyse aus 53 Studien und über 6000 Patienten konnte eine Ansprechrate von 12,4 % nachgewiesen werden. Auch bei IL-2 wurden komplette Tumorremissionen beobachtet, allerdings verursacht das Interleukin auch mehr Nebenwirkungen [Coppin et al. 2005]. Negrier et al. konnten feststellen, dass eine Kombination beider Substanzen zwar bessere Ansprechraten, jedoch keine Verlängerung der Überlebenszeit bringt [Negrier et al. 1998].

In den vergangenen Jahren konnten aufgrund des besseren Verständnisses der für das Tumorstadium verantwortlichen Signalwege neue Substanzen zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms entwickelt werden. Vor allem die Identifizierung des VEGF-Signalweges sowie des mTOR-Signalweges (s. Abbildung 6) führte zur Entdeckung neuer Angriffspunkte in der Tumorthherapie. Die Substanzen, welche in die genannten Signalwege eingreifen, werden als „Targeted Therapeutika“ bezeichnet.

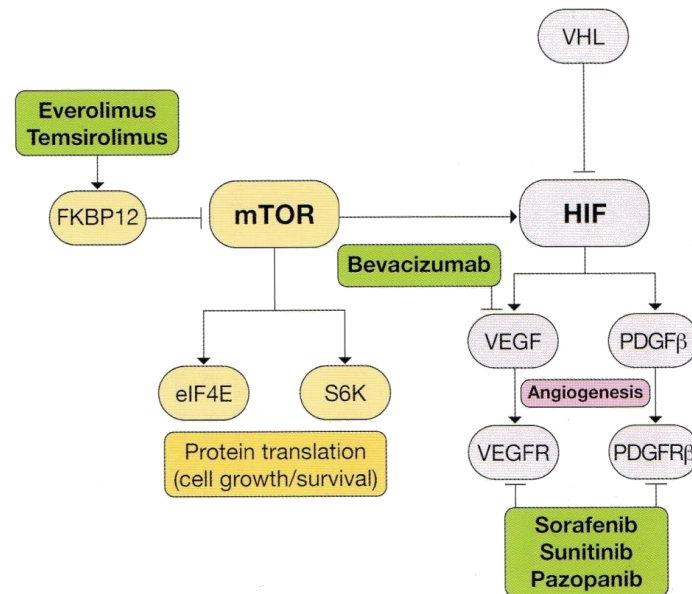


Abbildung 6: VHL-HIF-Signalweg, mTOR-Signalweg und Angriffspunkte der „Targeted-Therapeutika“ (VHL= von-Hippel-Lindau, HIF= Hypoxie-induzierter Faktor, VEGF= vascular endothelial growth factor, VEGFR= Vascular endothelial growth factor-Rezeptor, PDGFβ= platelet derived growth factor β, PDGFRβ= platelet derived growth factor-Rezeptor β, FKBP-12= FK-bindendes Protein 12, mTOR= mammalian target of Rapamycin, eIF4E= eukaryotischer Translations-Initiierungsfaktor 4E, S6K= S6-Kinase) [Escudier, Gore 2010]

VEGF-Pathway und dort angreifende Therapeutika

Das bereits oben erwähnte von-Hippel-Lindau-Gen (VHL-Gen) fungiert als Tumorsuppressor-Gen. Bei Patienten, die an der von-Hippel-Lindau-Krankheit leiden, ist die Genaktivität des VHL-Gens entweder sehr niedrig oder völlig fehlend [Latif et al. 1993]. Aber auch in 90% der sporadisch auftretenden Nierenzellkarzinome kann eine Inaktivierung des VHL-Gens nachgewiesen werden [Gnarra et al. 1994]. Hierbei scheint die Inaktivierung nach einem klassischen „two-hit“-Modell vonstatten zu gehen. Nachdem bereits ein Allel des Gens inaktiviert ist, kommt es entweder durch Genmutation oder durch Gen-Inaktivierung mittels Methylierung auch zum Ausfall

des zweiten Allels [Herman et al. 1994, Nickerson et al. 2008]. Bei Inaktivierung beider Allele ist das VHL-Gen funktionslos, es wird also kein funktionierendes VHL-Protein (pVHL) produziert. Unter normoxischen Bedingungen degradiert das pVHL den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF). Durch eine hohe Konzentration an HIF (bei fehlender Degradierung durch pVHL) wird der Zelle eine Pseudohypoxie vermittelt. Das aktivierte HIF wandert in den Zellkern und initiiert die Transkription verschiedener Gene [Kondo et al. 2002], u.a. die Gene für VEGF (vascular endothelial growth factor), ein sehr stark proangiogenetisch wirksames Protein [Gnarra et al. 1996], PDGF (platelet derived growth factor) oder TGA- α (Transforming growth factor alfa) [de Paulsen et al. 2001]. Dieser Signalweg ist insbesondere in Tumorzellen, aber auch in Zellen des Tumor-Microenvironment (tumor-assoziierte Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten) sehr stark aktiviert, da die Angiogenese eine Schlüsselrolle für das Überleben und Wachstum des Tumors darstellt [Ferrara et al. 2003].

Bevacizumab (Avastin®) ist ein rekombinanter, monoklonaler Antikörper, welcher an zirkulierendes VEGF-Protein bindet und es so neutralisiert [Presta et al. 1997]. Dadurch können Angiogenese und Tumorwachstum behindert werden. Bevacizumab in Kombination mit Interferon α führt im Vergleich zu einer INF- α -Monotherapie zu einem längeren progressionsfreien Überleben (8,5 Monate mit Kombinationstherapie vs. 5,2 Monate mit Monotherapie) [Rini et al. 2008, 2010].

Weitere Medikamente, die in den VEGF-Signalweg eingreifen sind: Sunitinib (Sutent®), Sorafenib (Nexavar®), Pazopanib (Votrient®), Axitinib (Inlyta®) sowie Tivozanib. Diese Medikamente werden auch als Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren bezeichnet. Sie binden an verschiedene Rezeptortyrosin-Kinasen und unterbinden so die für Tumorwachstum und –progression, Metastasierung sowie Gefäßneubildung wichtigen Signalwege [Faivre et al. 2007]. Welche Tyrosinkinasen von den jeweiligen Therapeutika inhibiert werden, zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Tyrosinkinase-Inhibitoren und ihre molekularen Angriffspunkte (c-Kit= Tyrosinkinase KIT, FLT3= fetal-liver-Tyrosinkinase-Rezeptor 3, RET= RET-Proto-Onkogen, VEGFR= vascular endothelial growth factor-Rezeptor, PDGFR= platelet derived growth factor-Rezeptor, CSR-1R= Colony-stimulating factor-1-Rezeptor, b-RAF, c-RAF= rapidly accelerated fibrosarcoma-Proteinkinase b, c) [nach Abe 2013, Escudier 2012]

Tyrosinkinase-Inhibitor	Targets
Sunitinib (Sutent®)	c-Kit, FLT3, RET, VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- α , - β , CSR-1R
Sorafenib (Nexavar®)	c-Kit, FLT3, RET, VEGFR-2, -3, PDGFR- β , b-RAF, c-RAF
Pazopanib (Votrient®)	c-Kit, VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- α , - β , CSF-1R
Axitinib (Inlyta®)	c-Kit, VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- α , - β
Tivozanib	VEGFR-1, -2, -3

Für viele der oben aufgeführten Substanzen konnte ein Therapievorteil verglichen mit Placebo oder einer Interferon-Monotherapie festgestellt werden [Escudier et al. 2012].

Auf Sunitinib als wichtigsten und zurzeit am häufigsten eingesetzten Vertreter dieser Gruppe wird weiter unten noch ausführlicher eingegangen.

Sorafenib bringt im Vergleich mit Interferon- α -2a nur einen sehr geringen Vorteil im progressionsfreien Überleben (5,7 Monate unter Sorafenib vs. 5,6 Monate unter Interferon) [Escudier et al. 2009]. Bei Patienten mit therapierefraktärem metastasiertem Nierenzellkarzinom konnte bei Therapie mit Sorafenib im Vergleich zur Placebo-Gruppe ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben sowie Gesamtüberleben gezeigt werden [Escudier et al. 2007]. Aktuell wird Sorafenib überwiegend als second-line Therapie eingesetzt.

Patienten, die mit Pazopanib behandelt wurden, zeigten sowohl gegen Placebo als auch gegen Patienten, die vorher mit Interferon behandelt wurden, ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben [Sternberg et al. 2010]. Pazopanib wird sowohl als first- als auch als second-line-Therapie bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom verwendet.

mTOR-Pathway und dort angreifende Therapeutika

mTOR (mammalian target of rapamycin) ist eine Serin-/Threonin-Kinase, welche eine entscheidende Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse spielt, etwa die Kontrolle über Zellproliferation, -motilität oder Angiogenese [Jiang, Liu 2008]. In Tumorzellen des Nierenzellkarzinoms, aber auch anderer Tumorentitäten, ist der mTOR-Signalweg überaktiviert [Sabatini 2006]. In menschlichen Zellen gibt es zwei strukturell und funktionell unterschiedliche mTOR-Komplexe: der Rapamycin-sensitive mTORC1 sowie der Rapamycin-insensitive mTORC 2. Die aktuell verfügbaren mTOR-Inhibitoren, Temsirolimus (Torisel®) und Everolimus (Afinitor®), werden als sog. „Rapalogs“, also Rapamycin-Analoga bezeichnet. Sie binden an ein intrazelluläres Protein (FKBP-12 = FK-binding protein 12) und bilden so einen Komplex, welches die mTOR-Serin-/Threonin-Kinase inhibiert [Le Tourneau et al. 2008].

Die beiden mTOR-Inhibitoren greifen nur am rapamycin-sensitiven mTORC1 an. Das heißt, die mTOR-Aktivität kann nicht vollständig unterbunden werden [Guertin, Sabatini 2005].

Für Temsirolimus konnten Hudes et al. sowohl ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben als auch Gesamtüberleben im Vergleich zur Interferon-Therapie nachweisen [Hudes et al. 2007]. Die Leitlinien empfehlen Temsirolimus als Erstlinien-Therapie für „High-Risk“- Patienten.

Therapieauswahl, Prognosekriterien

Die Entscheidung, welche Therapie ein Patient mit metastasiertem Nierenzellkarzinom erhalten soll, hängt vom Alter und Allgemeinzustand des Patienten, dem histologischen Subtyp des Tumors sowie verschiedenen Prognosefaktoren ab. Hierfür identifizierte Motzer fünf Risikofaktoren, welche zu einer Verschlechterung der Prognose führen. Diese wurden im Memorial Sloan Kettering Cancer Center Score (MSKCC) zusammengefasst (s. Tabelle 5). Je nach Anzahl der Risikofaktoren erfolgt die Einteilung in verschiedene Risikogruppen (s. Tabelle 6). Abhängig von der Risikokonstellation des Patienten wird eine entsprechende Therapie empfohlen (s. Tabelle 7).

Tabelle 5: MSKCC-Score (LDH= Laktatdehydrogenase) [nach Motzer 1999]

Risikofaktor	Grenzwerte
Karnofsky-Index	< 80%
LDH- Serumspiegel	< 1,5-fach des oberen Normwertes
Hämoglobin-Spiegel	< unterer Normwert
Serum-Kalzium-Spiegel (korrigiert)	> 10mg/dl
Zeit zwischen Tumorentfernung und Metastasenbildung	< 1 Jahr

Tabelle 6: Prognosegruppen nach Motzer

Prognose	Anzahl der Risikofaktoren	Mittleres Überleben (in Monaten)
Gut	0	30
Intermediär	1-2	14
Schlecht	3-5	5

Tabelle 7: Therapieoptionen beim metastasierten Nierenzellkarzinom [Escudier et al. 2012]

	Risikogruppe	Standardtherapie	Alternativtherapie
First-line Therapie	Niedrig oder intermediär	Sunitinib Bevacizumab + IFN Pazopanib	Konventionelle Immuntherapie Sorafenib
First-line Therapie	hoch	Temsirolimus	Sunitinib Sorafenib
Second-line Therapie	Nach Zytokinbehandlung	Sorafenib Pazopanib Axitinib	Sunitinib
Second-line Therapie	Nach TKI-Behandlung	Everolimus Axitinib	Sorafenib
Third-line Therapie	Nach 2 TKI-Behandlung	Everolimus	

2.2 Sunitinib

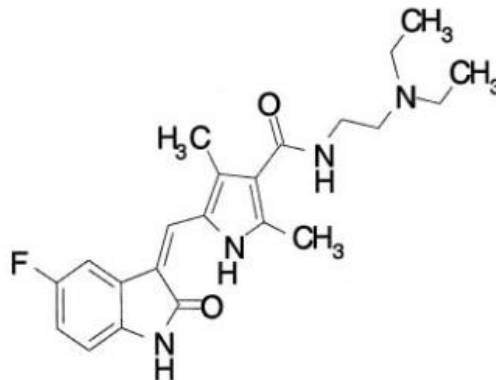


Abbildung 7: Strukturformel von Sunitinib [Mendel et al. 2003]

Sunitinib (Sunitinib-Malat, SU11248, Handelsname Sutent®) ist ein oral einsetzbarer Tyrosinkinase-Inhibitor, der vorwiegend am VEGF- und am PDGF-Rezeptor, aber auch an einer Vielzahl anderer Rezeptoren wirkt (s. Tabelle 4). Dabei bindet Sunitinib mit 10- bis 30-mal stärkerer Affinität an die Rezeptoren als die eigentlichen Liganden VEGF und PDGF [Mendel et al. 2003] und inhibiert die Gefäßneubildung. Daneben hat Sunitinib auch einen direkten antiproliferativen Effekt. Die für die Inhibierung des VEGFR und des PDGFR notwendige Plasmakonzentration beträgt zwischen 50 und 100 ng/ml [Chow, Eckardt 2007].

Nach der Einnahme von Sunitinib wird dieses zu einem aktiven Metaboliten (SU12662) verstoffwechselt. Beide Stoffe haben eine hohe Plasmaeiweißbindung (90-95%). Die maximale Plasmakonzentration wird 5 Stunden nach Einnahme erreicht. Die Halbwertszeit von Sunitinib beträgt 40-60 Stunden, die des Metaboliten SU12662 80-100 Stunden. Die Verstoffwechslung erfolgt vorzugsweise über CYP3A4, ein Isoenzym des Cytochrom P450. Da auch viele andere Medikamente (z.B. Antihypertensiva, Antimykotika, Tuberkulostatika) über dieses System metabolisiert werden, kann es zu Wechselwirkungen zwischen diesen Pharmazeutika kommen, sodass die Dosis dementsprechend angepasst werden muss. Sunitinib wird bevorzugt über den Stuhl und nur zu einem geringen Teil über die Niere ausgeschieden [Pfizer: Sutent® U.S Physician Prescribing Information].

In einer randomisierten Phase III-Studie konnte für Sunitinib im Vergleich zu INF- α ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben festgestellt werden (11 Monate unter Sunitinib vs. 5 Monate unter INF- α). Auch das Gesamtüberleben unter

Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor war deutlich verlängert (26,4 Monate vs. 21,8 Monate unter INF- α) [Motzer et al. 2007, 2009].

Sunitinib wird in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms als Erstlinien-Therapeutikum empfohlen, insbesondere bei Patienten mit niedriger oder moderater Risikokonstellation nach MSKCC-Score [Ljungberg et al. 2010]. Hierbei werden die Patienten nach einem 4/2-Schema behandelt, das heißt, nach einer vierwöchigen Behandlung mit einer Tagesdosis von 50mg folgt eine zweiwöchige Pause. Dieses Schema zeigt bei einer annehmbaren Anzahl und Ausprägung von Nebenwirkungen die beste Wirkung [Faivre et al. 2006]. Als alternative Therapieschemata wurden z.B. das 2/1-Schema (zwei Wochen Behandlung mit Sunitinib 50mg, eine Woche Pause) [Britten et al. 2008] oder die kontinuierliche Behandlung mit 37,5mg Sunitinib täglich [George et al. 2008] getestet.

Die wichtigsten und häufigsten Nebenwirkungen von Sunitinib sind: Fatigue, Asthenie, gastrointestinale Nebenwirkungen (Diarrhö, Übelkeit, Erbrechen), Arthralgien, Hautausschlag, Hand-Fuß-Syndrom sowie Hypertonie. Als weitere Nebenwirkungen sind bekannt: Myelosuppression mit Panzytopenie, Erhöhung der Leberenzyme AST und/oder ALT, erhöhte Lipasewerte, erhöhte Kreatininwerte sowie verminderte linksventrikuläre Auswurfraction [Adams, Leggas 2007]. Auch eine Hypothyreose wurde bei Patienten während der Behandlung mit Sunitinib vermehrt beobachtet [Rini et al. 2007]. Bei nicht tolerablen Nebenwirkungen kann die Dosis von Sunitinib in Schritten von jeweils 12,5mg reduziert werden. Die Behandlung sollte nur bei schweren unerwünschten Wirkungen abgebrochen werden, z.B. bei kongestivem Herzversagen oder Leberversagen [Hutson et al. 2008].

Neben der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist Sunitinib auch zur Behandlung Imatinib-refraktärer gastrointestinaler Stromatumore zugelassen [Gan et al. 2009].

2.3 Resistenz gegen Tyrosinkinase-Inhibitoren

Eine ständige Versorgung von Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen ist wichtig für die Funktion und das Überleben einer Zelle. Bei Wachstum von Geweben ist daher auch immer eine adäquate Neubildung von Blutgefäßen essentiell. Der Prozess der Gefäßneubildung ist in gesunden Geweben streng reguliert und wird nur in Ausnahmesituationen, z.B. bei der Wundheilung, aktiviert [Hanahan, Folkman 1996].

In Tumorgewebe erfolgt dieser Prozess aufgrund des raschen Wachstums maligner Zellverbände jedoch verstärkt und unkontrolliert, sodass die Angiogenese als eines der Hauptkennzeichen maligner Zellentartung angesehen wird [Hanahan, Weinberg 2000]. Da alle menschlichen Tumoren von einer effizienten Angiogenese abhängig sind, bietet sich hier ein idealer Angriffspunkt in der Tumorthherapie [Ferrara, Kerbel 2005]. Insbesondere beim weitestgehend chemo- und strahlenresistenten Nierenzellkarzinom hat die Entwicklung antiangiogenetischer Therapeutika die Behandlung von Patienten mit metastasiertem Tumorleiden revolutioniert [Gordon, Ebbinghaus 2008]. Da die Tumoren stark vaskularisiert sind, reagieren sie besonders empfindlich auf die Unterbindung der Gefäßbildung. Die Substanzen haben aber auch eine antiproliferative Wirkung auf die Tumorzelle selbst. So können die Tumorlast deutlich gesenkt und das Überleben der Patienten verlängert werden. Leider entwickeln nahezu alle Patienten im Laufe der Behandlung Resistenzen gegenüber des Therapeutikums, im Mittel nach 6 bis 15 Monaten [Rini, Atkins 2009]. Im klinischen Alltag wird versucht, diesen durch Sequenztherapie entgegenzuwirken, wobei man hier noch wenig über das langfristig erfolgreichste Vorgehen weiß [Dudek et al. 2009].

Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen der Resistenzentwicklung sind bis heute nicht verstanden. In den letzten Jahren wurde zunehmend zwischen einer intrinsischen, d.h. prä-existenten, und einer erworbenen Resistenz unterschieden [Bergers, Hanahan 2008]. Dabei scheint die intrinsische Resistenz direkt von der Tumorzelle auszugehen, etwa durch besonders effektive Efflux-Mechanismen [Singhal et al. 2010]. Weiterhin wurden verschiedene Ursachen einer erworbenen Resistenz postuliert, etwa eine Mutation des VEGF-Rezeptors oder eine Selektion von Tumorzellen mit intrinsischer Resistenz gegen antiangiogenetische Therapien. Doch keine dieser Erkenntnisse hat bisher dazu geführt, die Resistenzentwicklung wirksam und dauerhaft verhindern zu können.

3. Ziele der Arbeit

Bei ca. 15-20% der Patienten mit Nierenzellkarzinomen werden bereits bei Diagnosestellung Metastasen festgestellt, weitere 20-30% der Patienten entwickeln metachron Metastasen. Da das Nierenzellkarzinom jedoch kaum auf konventionelle Chemotherapie oder eine Radiatio anspricht, hat sich in den letzten Jahren v.a. die antiangiogenetische Therapie mit Multi-Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sunitinib (Sutent®) etabliert. Auch wenn primär 65% der Patienten auf die Therapie mit Sunitinib, aber auch anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren, ansprechen, ist bei nahezu allen Patienten nach einiger Zeit wieder ein Progress und somit eine Resistenzentwicklung zu verzeichnen.

Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Resistenzentwicklung sind bis heute nur unzureichend verstanden. Es ist essentiell, diese Mechanismen zu identifizieren, um neue Therapiestrategien und prädiktive Marker für eine individuelle Therapie zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, gegen Sunitinib resistente Zelllinien zu etablieren und zu charakterisieren. Hierzu sollen folgende Aufgabenstellungen erfüllt werden:

1. Analyse des antiproliferativen Effektes von Sunitinib auf vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien und Definition des IC50-Wertes.
2. Etablierung einer auf Sunitinib resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie
3. Charakterisierung von zellbiologischen Parametern unter der Therapie

4. Material und Methoden

4.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 8: verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte

B Braun Melsungen AG, Melsungen	2/5/10/20ml Einmalspritzen steril
Becton Dickinson Biosciences, Bedford, USA	6- Well-Companionplate für Zellkultur 24-Well-Companionplate für Zellkultur 24-Well Inserts 8,0 µm 96-Well-Platte für Zellkultur Falcon® 1/2/5/10/25 ml serological pipets Zellkulturflaschen 25cm ² Zellkulturflaschen 75cm ² Zentrifugenröhrchen Rundboden (15ml)
Carl Zeiss, Jena	Mikroskop Axiovert S100
Eppendorf, Hamburg	Aufsätze für Multipipette® plus 4780: 500µl, 1ml, 5ml Multipipette® plus 4780 Tischzentrifuge MiniSpin Tubes 0,5ml, 1,5ml Zentrifuge 5804
Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel	Schüttelwasserbad 1083
Gilson, Middleton, USA	Pipetten 1000µl, 200µl, 10µl
Greiner Bio-one	Pipettenspitzen für Gilson®-Pipetten 1000µl (blau), 200µl (gelb), 10µl (weiß)
Integra Biosciences (IBS), Fernwald	Absaugpumpe Vacuboy® Absaugsystem VacuSafe Elektronische Pipettierhilfe pipetboy acu
Kendro Laboratory Products, Hanau	Brutschrank Heraeus HeraCell Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe HS12

Medax Nagel, Kiel	Heizplatte
Merck Millipore, Darmstadt	Sterilfilter 0,1µm
neoLab, Heidelberg	Vortex Mixer Genie®
Poulten & Graf, Wertheim am Main	Volac Glaspipetten lang, kurz
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	BrdU Cell Proliferation ELISA (colorimetric) Kit Cell Death Detection Elisa Plus Kit (CDD+) Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH) WST-1 Cell Proliferation Reagent XTT Cell Proliferation Kit II
Tecan, Crailsheim	Assay-Reader Infinite F200 pro

4.2 Chemikalien

Tabelle 9: verwendete Chemikalien und Medien

Sigma-Aldrich, Steinheim	DMEM + Phenolrot DMSO Fetales Kälberserum MEM + Phenolrot L-Glutamine PenStrep (Penicillin + Streptomycin) RPMI-1640 + Phenolrot Trypsin-EDTA 1x (0,5g Trypsin + 0,2g EDTA)
--------------------------	--

4.3 Zellkultur

4.3.1 Inspektion der Zellen

Die Zellen wurden täglich durch das Mikroskop bezüglich Morphologie, Wachstumsgeschwindigkeit und –muster sowie eventueller Auffälligkeiten inspiziert. Ein Medienwechsel wurde alle 2 Tage durchgeführt, eine Passagierung in Abhängigkeit von der Konfluenz, in der Regel ein- bis zweimal pro Woche.

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37° Celsius und einer CO₂-Atmosphäre von 5% kultiviert. Für die Untersuchungen wurden vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien verwendet (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien und ihre Charakteristika (RPMI= Rosepark memorial Institute; DMEM= Dulbecco's modified Eagle medium; MEM = Minimum Essential Medium; FCS= Fetales Kälberserum; PenStrep= Penicillin/Streptomycin; NEAA= nicht-essentielle Aminosäuren; VHL= von-Hippel-Lindau-Gen) [Giard et al. 1973, Williams et al. 1978, Iliopoulos et al. 1995, Ohh et al. 1998, Westenfelder, Baranowski 2000]

	786-O	A-498	CAKI-1	CAKI-2
<i>Herkunft</i>	m, 58, Kaukasier, radikale Nephrektomie 09/1975	m, 52, Ethnie unbekannt, radikale Nephrektomie 1973	m, 49, Kaukasier, isoliert 1975	m, 69, Kaukasier, isoliert 1975
<i>Tumortyp</i>	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	Nierenzellkarzinom, Subtyp unbekannt	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	Klarzelliges Nierenzellkarzinom
<i>VHL-Status</i>	-/-	-/-	+/+	+/+
<i>Verdopplungszeit</i>	ca. 30 Stunden	ca. 60 Stunden	ca. 48 Stunden	ca. 30 Stunden
<i>Medium</i>	RPMI 1640/DMEM (1:1), 10% FCS, 1% PenStrep, 1% NEAA	MEM, 10% FCS, 1% PenStrep,	RPMI 1640 10% FCS, 1% PenStrep	RPMI 1640 10% FCS, 1% PenStrep

4.3.2 Passagieren der Zellen

Zur Passagierung einer Zelllinie wurden aus der Zellkulturflasche zunächst ca. 2 ml Medium mittels gestopfter Pasteurpipette in ein Rundboden- Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde das restliche Medium mit einer langen Pasteurpipette abgesaugt. Um die adhärenenten Zellen vom Flaschenboden zu lösen, erfolgte danach die Zugabe von Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche (bei einer 75 cm²-Zellkulturflasche 5ml Trypsin/EDTA, bei einer 25cm²-Zellkulturflasche 2 ml Trypsin/EDTA). Nun wurde die Flasche mit dem Trypsin/EDTA 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellkulturflasche vorsichtig beklopft, um die restlichen Zellen vom Boden zu lösen. Die trypsinisierte Zellsuspension wurde anschließend mittels gestopfter Pasteurpipette in das Rundboden- Zentrifugenröhrchen überführt. Nun erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension für 3 Minuten bei 1100 Umdrehungen pro Minute. In der Zwischenzeit wurde eine neue Zellkulturflasche mit Medium befüllt (bei 25cm²-Zellkulturflaschen 4,5 ml Medium, bei 75 cm²-Zellkulturflaschen 12 ml Medium). Danach wurde der

Mediumüberstand über dem Zellpellet vorsichtig abgesaugt und dieses mit 1 ml neuem Medium resuspendiert. Nun erfolgte entweder die Zugabe des gewünschten Volumens der Zellsuspension in die neue Zellkulturflasche oder es wurde eine Zellzählung durchgeführt (siehe unten). Nach Zugabe der Zellsuspension in die neue Zellkulturflasche wurde diese vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Es erfolgte die erneute Inkubation im Brutschrank bei 37° Celsius und 5%iger CO₂-Atmosphäre.

4.3.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

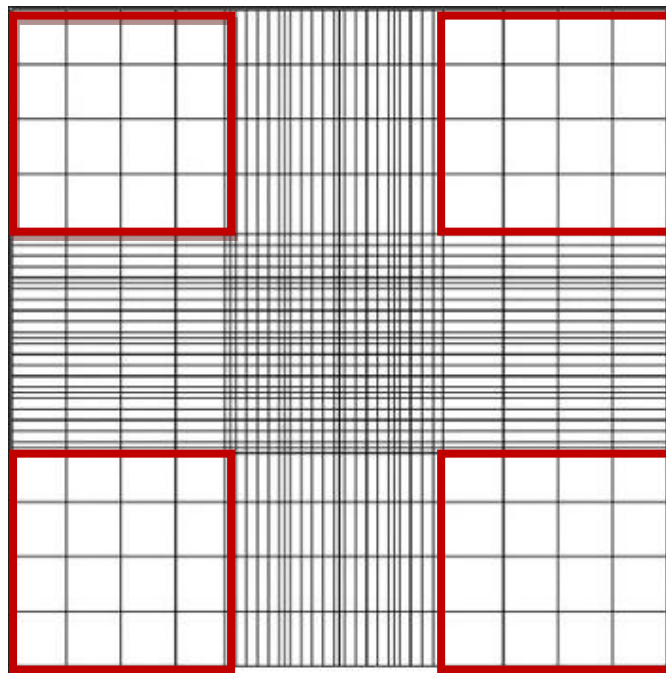


Abbildung 8: Schema einer Neubauer-Zählkammer [Lindl 2008]

Sollte bei der Passagierung von Zellen eine Bestimmung der Zellzahl durchgeführt werden, war die Vorgehensweise bis zum Resuspendieren des Zellpellets in 1ml Medium gleich. Nun wurden aber zu der Zellsuspension noch 2ml Medium hinzugegeben und erneut resuspendiert. Anschließend wurde eine kleine Menge der Suspension luftblasenfrei mittels gestopfter Pasteurpipette aufgenommen und auf eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer gegeben (s. Abbildung 8). Nun wurde die Zählkammer unter das Mikroskop gelegt. Die in den großen Quadraten (rot umrandet) liegenden Zellen wurden nun gezählt, wobei jedes große Quadrat einzeln

gezählt und dann die Summe der vier großen Quadrate gebildet wurde. Anschließend wurde wie folgt vorgegangen:

$$\frac{Q1 + Q2 + Q3 + Q4}{64} = \text{Zellzahl pro } 0,0025 \text{ m}^2 \text{ (Fläche eines kleinen Quadrats)}$$

$$\text{Zellzahl in einem kleinen Quadrat} \times 160 = \text{Zellzahl pro ml} \times 10^3$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl pro ml} \times 10^6 \times \text{Gesamtsuspension in ml}$$

$$\text{Benötigte Menge an Zellsuspension} = \frac{\text{gewünschte Zellzahl} \times \text{Gesamtsuspension in } \mu\text{l}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

4.3.4 Besetzen einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit Zellen zur Durchführung eines Assays

Um eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit Zellen zu besetzen, waren zunächst einige Vorbereitungen nötig. Da diese Platten bis zur Durchführung des Assays mehrere Tage im Brutschrank stehen, kann es besonders in den äußeren Wells der Platte zur Verdunstung von Medium kommen, sodass zum Beispiel die Konzentration einer im Well befindlichen Substanz erhöht würde und so die Zellen anders darauf reagieren würden. Um diesen verzerrenden Effekten vorzubeugen, wurden die äußeren Wells der Platte stets nur mit 200 μl Medium befüllt und keine Zellen darin ausgesät.

Zum Besetzen einer 96-Well-Platte wurden die Zellen wie oben beschrieben abtrypsiniert, das Zellpellet in Medium resuspendiert und eine Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die gewünschte Zielzellzahl ergab sich aus der gewünschten Zellzahl, die pro Well ausgesät werden sollte, sowie der Gesamtanzahl der mit der entsprechenden Zelllinie zu besetzenden Wells.

4.3.5 Passagieren von Zellen der Langzeitkultur CAKI-2 +/- Sunitinib

Bei der Langzeitkultur von CAKI-2 wurden eine Kontroll-Linie sowie eine Linie unter dauerhafter Behandlung mit Sunitinib in der Konzentration 5 μM parallel kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einer 6-Well-Platte, wobei 3 Wells mit der Kontrolle und 3 Wells mit den Zellen unter Dauerbehandlung unter Sunitinib 5 μM bestückt wurden. Die Vorversuche wurden mit einer Zellzahl von 1×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt, was einer Wachstumsfläche von 0,32 cm^2 entspricht.

Die Wachstumsfläche eines Wells einer 6-Well-Mikrotiterplatte beträgt 9,6 cm². Die Ausgangszellzahl für diesen Platten-Typ betrug dementsprechend 3×10^4 Zellen pro Well. Die Zellen wurden täglich im Mikroskop bezüglich Morphologie, Wachstumsgeschwindigkeit und –muster sowie eventueller Auffälligkeiten inspiziert. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage, eine Passagierung wurde alle 7 Tage durchgeführt. Dabei wurde die Zellzahl bestimmt.

4.3.6 Besetzen einer 96-Well-Mikrotiterplatte aus der Langzeitkultur CAKI-2 +/- Sunitinib

Da zu definierten Zeitpunkten Viability Assays sowie Proliferationsassays mit Zellen der Langzeitkultur durchgeführt wurden, wurde dann bei der Passage der Zellen auch eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit Zellen aus dieser bestückt. Die Zellen wurden dann wie folgt ausgesät: Die erste Kategorie waren stets Zellen aus der Kontrollgruppe, die nicht mit Sunitinib behandelt waren. Die zweite Kategorie stammte ebenfalls aus der Kontrolllinie der CAKI-2-Zellen. Diesen Zellen jedoch wurde 24 Stunden nach Aussaat auf der Mikrotiterplatte verschiedene Sunitinib-Konzentrationen zugesetzt. Die dritte Kategorie waren CAKI-2-Zellen aus der Langzeitkultur, die für die Dauer des Assays nicht mehr mit Sunitinib behandelt wurden. Die vierte Kategorie waren CAKI-2-Zellen aus der Langzeitkultur, die permanent unter dem Einfluss von Sunitinib standen. Die Auswertung des Assays erfolgte jeweils 5 Tage nach der Zugabe des Sunitinib.

4.4 Assays

4.4.1 Viability Assay mit dem Cell Proliferation Reagent WST-1

Das Cell Proliferation Reagent WST-1 (water soluble Tetrazolium) kann zur spektrophotometrischen Quantifizierung der Proliferation und der Vitalität von Zellpopulationen verwendet werden. Prinzip des Assays ist die Spaltung der in der Reaktionslösung enthaltenen Tetrazoliumsalze (Farbe: leicht rötlich) zu Formazan (Farbe: tieforange) durch zelluläre Enzyme (NAD-abhängige Dehydrogenasen). Je mehr vitale Zellen vorhanden sind, desto höher ist die Enzymaktivität, ergo können mehr Tetrazoliumsalze zu Formazan gespalten werden. Die Quantifizierung des

entstandenen Formazans erfolgt photometrisch durch einen ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 450nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620nm.

Zur Durchführung des Assays wurden in jedes belegte Well (Volumen im Well: 200µl) einer zuvor angesetzten 96-Well-Mikrotiterplatte (Prinzip s. oben) 20µl des Cell Proliferation Agent WST-1 pipettiert. Die Platte wurde zur Inkubation wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Die photometrische Messung erfolgte nach 30, 60, 90 und 120 Minuten.

Bei diesem Assay ist zu beachten, dass es auch in Abwesenheit von Zellen im Kulturmedium zu einer leichten Absorption kommt. Daher muss auch die Messung sogenannter „Blanks“ erfolgen, also lediglich das Kulturmedium ohne im Well befindliche Zellen. Der Absorptionswert der Blanks ist bei der Auswertung der Daten von den Absorptionswerten der mit Zellen besetzten Wells abzuziehen.

4.4.2 Cell Proliferation Kit II (XTT)

Auch dieser Assay dient zur Messung von Zellproliferation und –vitalität sowie der Zytotoxizität bestimmter Substanzen, etwa Chemotherapeutika. Das Prinzip dieses Tests basiert ebenso wie das des WST-1 auf der Spaltung eines Tetrazoliumsalzes (in diesem Fall XTT (=2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Natriumsalz, Farbe gelb) zu einem formazanhaltigen Farbstoff (Farbe orange) durch metabolisch aktive, also vitale Zellen. Auch hier erfolgt die Quantifizierung des entstandenen Formazans mittels photometrischer Messung durch einen ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 492nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620nm.

Zur Herstellung der XTT-Labeling-Mixtur wurden 10ml phenolrotfreies Medium, 5ml des XTT labelling reagents und 0,1ml des electron coupling reagents gemischt. Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde ausgeklopft und anschließend in jedes Well 150µl der oben beschriebenen Mischung hineinpipettiert. Danach wurde die Platte wieder in den Brutschrank gestellt. Die photometrische Messung erfolgte nach 2,3 und 4 Stunden. Auch bei diesem Assay wurde aus oben erläuterten Gründen der Hintergrund-Absorption stets ein Blank mitgeführt.

4.4.3 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric immunoassay)

Das Prinzip dieses Assays zur Messung der quantitativen Zellproliferation beruht auf der Detektion von BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin), welches als Thymidinanalogon bei der Proliferation von Zellen in deren DNA eingebaut wird. Es eignet sich u.a. zur Detektion der Chemosensitivität von Tumorzellen auf Zytostatika. Zur Durchführung des Assays wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit Zellen bestückt und 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von Sunitinib. Nun erfolgte die Inkubation der Platte für 3-5 Tage im Brutschrank. Nach Zugabe von 20µl BrdU labeling solution (in der das BrdU enthalten ist) pro Well wurde die Platte noch einmal für 15 bis 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte ausgeklopft und somit die Reaktion gestoppt. Nun wurden pro Well 200µl FixDenat solution zur Denaturierung der DNA hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Denaturierung der DNA diene hierbei der besseren Zugänglichkeit des BrdU für den entsprechenden Antikörper. Danach erfolgten die Zugabe von 100µl anti-BrdU-POD (dem Antikörper gegen BrdU, konjugiert mit Peroxidase) und eine 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen wiederholt gründlich mit PBS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Schließlich erfolgte die Zugabe von 100µl substrate solution (TMB = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) pro Well und eine Inkubation zwischen 5 und 30 Minuten bei Raumtemperatur. Durch Oxidation durch die am Antikörper gebundene Peroxidase entsteht aus TMB ein Farbstoff. Es erfolgte schlussendlich die photometrische Messung bei 450nm gegen eine Referenzlänge von 620nm. Hierbei korrelieren die gemessenen Absorptionswerte direkt mit der Menge an DNA-Synthese und somit mit der Anzahl der proliferierenden Zellen.

4.4.4 Cytotoxicity Detection Kit LDH (Plus) (colorimetric assay)

Dieser Assay dient der Quantifizierung von Zelltod und Zelllyse, basierend auf der Messung von Laktatdehydrogenase (LDH), einem ubiquitär vorkommenden intrazellulären Enzym, das bei Zerstörung der Zellmembran aus dem Zytosol von Zellen freigesetzt wird. Es lässt sich also unter anderem das zytotoxische Potenzial verschiedener Medikamente auf bestimmte Zellen quantifizieren.

Bei der Durchführung dieses Assays müssen einige Dinge beachtet werden:

1. Das im Zellkulturmedium enthaltene fetale Kälberserum (FCS) enthält ebenfalls LDH, was die Hintergrund- Absorption erhöhen könnte. Aus diesem Grund ist es wichtig, zur Durchführung des Assays die Zellen in Medium mit hitzeinaktiviertem FCS zu kultivieren, um eine Verfälschung des Ergebnisses zu verhindern.
2. Bei der Durchführung des Assays sind verschiedene Kontrollen nötig.
 - Hintergrund-Kontrolle („Blank“) zur Feststellung der LDH-Aktivität im Zellkulturmedium
 - Low control zur Determinierung der LDH-Aktivität von normalen, nicht behandelten Zellen
 - High control: zur Feststellung der maximalen LDH-Aktivität in unbehandelten Zellen; erhält man durch Zugabe von Lyse-Reagenz

Zur Durchführung des Assays wurden zunächst 10µl Lyse-reagenz in die Wells der „High control“ pipettiert und diese für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden aus jedem Well 100µl Überstand auf eine neue 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Es erfolgte nun die Zugabe von 100µl reaction mixture pro Well auf der neuen Platte und die lichtgeschützte Inkubation für 15 Minuten. Die reaction mixture besteht zum Einen aus einer NADH-Dehydrogenase (im Bild: catalyst), zum Anderen aus dem Tetrazoliumsalz INT (s. Abbildung 9).

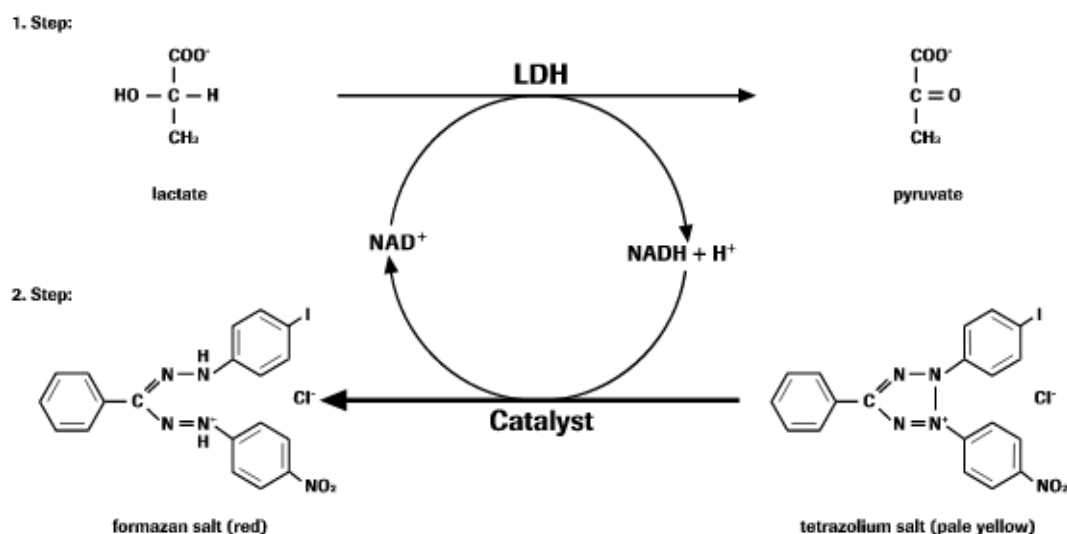


Abbildung 9: Prinzip des Cytotoxicity Detection Kit

Im ersten Schritt der Reaktion wird durch die Laktatdehydrogenase aus Laktat Pyruvat gebildet, und zwar unter gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH. Das

entstandene NADH wird dann von der NADH-Dehydrogenase (dem catalyst) wiederum oxidiert, wobei der Wasserstoff auf das INT übertragen wird, aus dem dann das orangefarbene Formazan entsteht. Die Reaktion wurde dann mit 50 ml Stop solution (Salzsäure) pro Well beendet. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 492nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620nm.

4.4.5 Cell Death Detection ELISA Plus

Prinzip dieses Assays ist die qualitative und quantitative Messung von zytoplasmatischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten nach Apoptose (induziertem Zelltod) mittels ELISA. Histone sind als Bestandteile des Chromatins u.a. für die „Verpackung“ der DNA wichtig. Abbildung 10 zeigt veranschaulicht den Ablauf des Assays.

Zur Durchführung des Assays wurden die Zellen 5 Tage auf einer 96-Well-Platte inkubiert. Zum Start wurde aus jedem Well 180µl Medium entnommen und durch 200µl Lysis Buffer pro Well ersetzt. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur sowie eine 10-minütige Zentrifugation bei 900 Umdrehungen/Minute. Dieser Schritt diente der Zelllyse sowie der DNA-Denaturierung. Dabei entstehen Nukleosomen (= Histon-assoziierte DNA-Fragmente).

Anschließend wurden aus jedem Well 20µl Überstand auf eine mit Streptavidin gecoatete Platte überführt. Streptavidin ist ein von der Bakterienspezies *Streptomyces avidinii* synthetisiertes Protein, welches eine starke Affinität zu Biotin (Vitamin H) besitzt. Dieses Prinzip macht man sich zunutze, um Antikörper (in diesem Falle den Anti-Histon-Antikörper, der mit seinen Biotin-Bestandteilen am Streptavidin bindet) auf einer Mikrotiterplatte zu fixieren.

Ab diesem Zeitpunkt mussten noch zwei Kontrollen mitgeführt werden: eine Positivkontrolle (konzentrierter DNA-Histon-Komplex) sowie eine Hintergrund-Kontrolle (unbehandelte Zellen). Diese dient dazu, die Rate des spontanen induzierten Zelltodes, der in jeder Zellkultur vorkommt, zu detektieren.

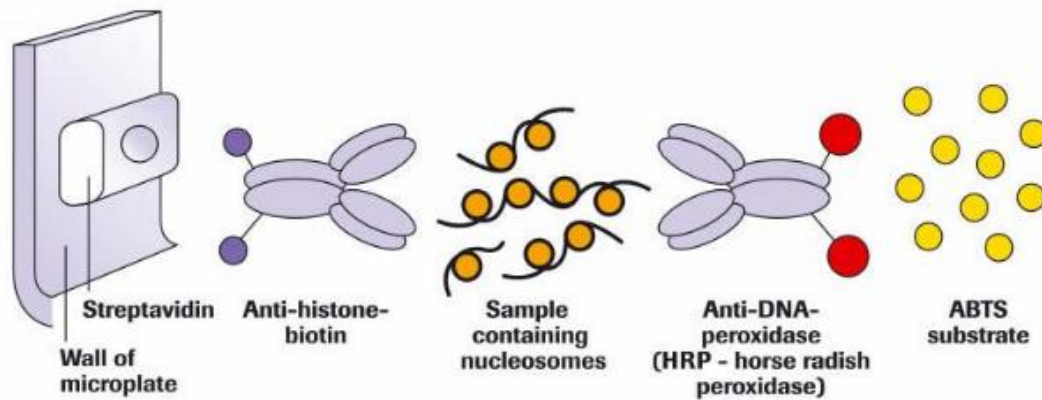


Abbildung 10: Prinzip des Cell Death Detection ELISA plus

Dazu wurden 80µl Immunoreagent (Gemisch aus Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-Peroxidase) gegeben, die Wells mit Folie verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln mit 300 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Hierbei bindet der Anti-Histon-Biotin-Antikörper zum Einen über die Biotin-Anteile an das Streptavidin (wie oben erläutert), zum Anderen an die Histon-Anteile der DNA-Fragmente. Der Anti-POD- Antikörper bindet an die DNA-Fragmente der Nukleosomen.

Danach wurden die Wells gründlich mit Incubation Buffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte eine 10-bis 20-minütige Inkubation unter Schütteln mit 100µl ABTS-Lösung pro Well. Das bei der Spaltung von ABTS (Diammoniumsalz 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) gebildete Radikal ist in wässrigem Milieu grün und kann deshalb photometrisch detektiert werden.

Nach Zugabe von 100 µl ABTS Stop Solution erfolgte abschließend die photometrische Messung bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 490nm.

5. Ergebnisse

5.1 Analyse des antiproliferativen Effektes von Sunitinib auf vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien und Definition des IC₅₀-Wertes

Die Analyse des antiproliferativen Effektes von Sunitinib auf die vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien 786-O, A-498, CAKI-1 und CAKI-2 wurde als Viability-Assay mithilfe des Cell Proliferation Agent WST-1 durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Sunitinib-Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 20 µM verwendet, um für jede Zelllinie individuell einen IC₅₀-Wert definieren zu können. Die Aussaat der Zellen erfolgte standardmäßig in einer Zellzahl von 1x10³ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Um zu überprüfen, ob sich die Wachstumsdichte einer Zellpopulation auf die Sensitivität gegenüber der Substanz auswirkt, wurden auch Versuche mit einer höheren Zellzahl durchgeführt. Hier betrug die anfängliche Zellzahl 2,5x10³ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Die Auswertung erfolgte jeweils nach 5 Tagen der Behandlung mit Sunitinib. Um stabile Ergebnisse zu erhalten, wurden die Viability Assays zur Ermittlung des IC₅₀-Wertes mehrmals mit dem gleichen Versuchsablauf wiederholt.

Der IC₅₀-Wert wurde jeweils für die Ausgangszellzahl von 1x10³ Zellen pro Well definiert, da eine geplante Langzeitkultur ebenfalls mit dieser Zellzahl angelegt werden sollte.

5.1.1 Antiproliferativer Effekt von Sunitinib auf 786-O und IC₅₀-Wert

Ausgangszellzahl 1x10³/Well

Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des Viability Assays WST-1 zur Ermittlung des IC₅₀-Wertes für die Zelllinie 786-O mit einer Zellzahl von 1x10³ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Standardabweichung befindet sich jeweils in Klammern darunter. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse in Prozent. Dabei wurden die Absorptionswerte der unbehandelten Kontrolle 100 Prozent gesetzt und die Absorptionswerte der mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen behandelten Zellen jeweils in Prozent verglichen mit der unbehandelten Kontrolle

berechnet. Dieses Vorgehen wurde auch bei den drei anderen Zelllinien A-498, CAKI-1 und CAKI-2 mit den beiden unterschiedlichen Zellzahlen angewandt.

Tabelle 11: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays der Zelllinie 786-O in Zellzahl 1×10^3 /Well unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; p= Passage)

	786-O p19	786-O p21	786-O p23	786-O p24	786-O p25	786-O p35
K	1,65 ($\pm 0,03$)	1,36 ($\pm 0,06$)	2,53 ($\pm 0,07$)	2,44 ($\pm 0,06$)	2,62 ($\pm 0,24$)	2,7 ($\pm 0,03$)
0,1μM	1,65 ($\pm 0,03$)	1,38 ($\pm 0,04$)	2,54 ($\pm 0,03$)	2,38 ($\pm 0,01$)	---	---
1μM	1,71 ($\pm 0,05$)	1,43 ($\pm 0,02$)	2,5 ($\pm 0,03$)	2,32 ($\pm 0,07$)	2,51 ($\pm 0,07$)	2,61 ($\pm 0,02$)
2μM	---	---	---	---	---	2,45 ($\pm 0,02$)
3μM	---	---	---	---	---	2,2 ($\pm 0,08$)
4μM	---	---	---	---	---	2,01 ($\pm 0,07$)
5 μM	1,25 ($\pm 0,06$)	0,53 ($\pm 0,04$)	1,17 ($\pm 0,04$)	1,84 ($\pm 0,05$)	1,53 ($\pm 0,07$)	1,57 ($\pm 0,07$)
6 μM	---	---	---	---	1,3 ($\pm 0,06$)	1,31 ($\pm 0,05$)
20μM	---	0,01 ($\pm 0,01$)	0 (± 0)	0,05 ($\pm 0,01$)	---	---

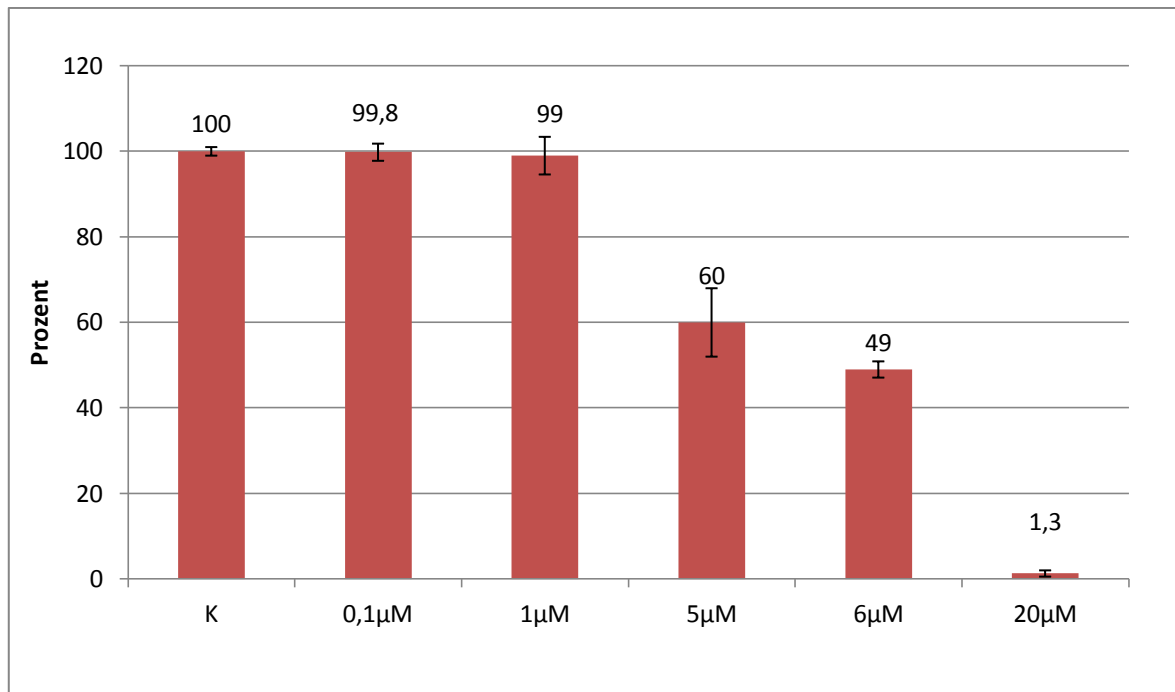


Abbildung 11: Ergebnisse des Viability Assays WST-1 der Zelllinie 786-O in Zellzahl 1×10^3 /Well unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen (K= unbehandelte Kontrolle)

Die Nierenzellkarzinom-Zelllinie 786-O (Ausgangszellzahl 1×10^3 /Well) zeigt bei einer Sunitinib-Konzentration von 0,1 µM mit 99,8 Prozent keine verminderte Viability im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (s. Abbildung 11). Auch bei einer Konzentration von 1µM des Tyrosinkinase-Inhibitors ist die Viability mit 99 Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht vermindert. Bei einer Konzentration von 5 µM Sunitinib ist die Viability im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bereits auf ca. 60 Prozent vermindert, bei 6 µM sind noch 50 Prozent der Zellen vital. Bei einer sehr hohen Substanzkonzentration von 20 µM sind schließlich nahezu keine vitalen Zellen mehr nachweisbar (1,3 Prozent verglichen mit der unbehandelten Kontrolle).

Ausgangszellzahl $2,5 \times 10^3$ /Well

Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des Viability Assays WST-1-für die Zelllinie 786-O mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Tabelle 12: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450nm) des WST-1-Assays der Zelllinie 786-O in Zellzahl $2,5 \times 10^3$ /Well unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; p= Passage)

	786-O p 19	786-O p21	786-O p23	786-O p24
K	2,75 ($\pm 0,03$)	2,57 ($\pm 0,08$)	2,37 ($\pm 0,05$)	2,6 ($\pm 0,03$)
0,1μM	2,76 ($\pm 0,07$)	2,44 ($\pm 0,11$)	2,36 ($\pm 0,06$)	2,52 ($\pm 0,03$)
1μM	2,61 ($\pm 0,07$)	2,57 ($\pm 0,15$)	2,23 ($\pm 0,03$)	2,5 ($\pm 0,04$)
5μM	2,12 ($\pm 0,03$)	1,17 ($\pm 0,03$)	2,1 ($\pm 0,2$)	1,85 ($\pm 0,02$)
20μM	---	0,02 (± 0)	0,03 (± 0)	0,01 ($\pm 0,01$)

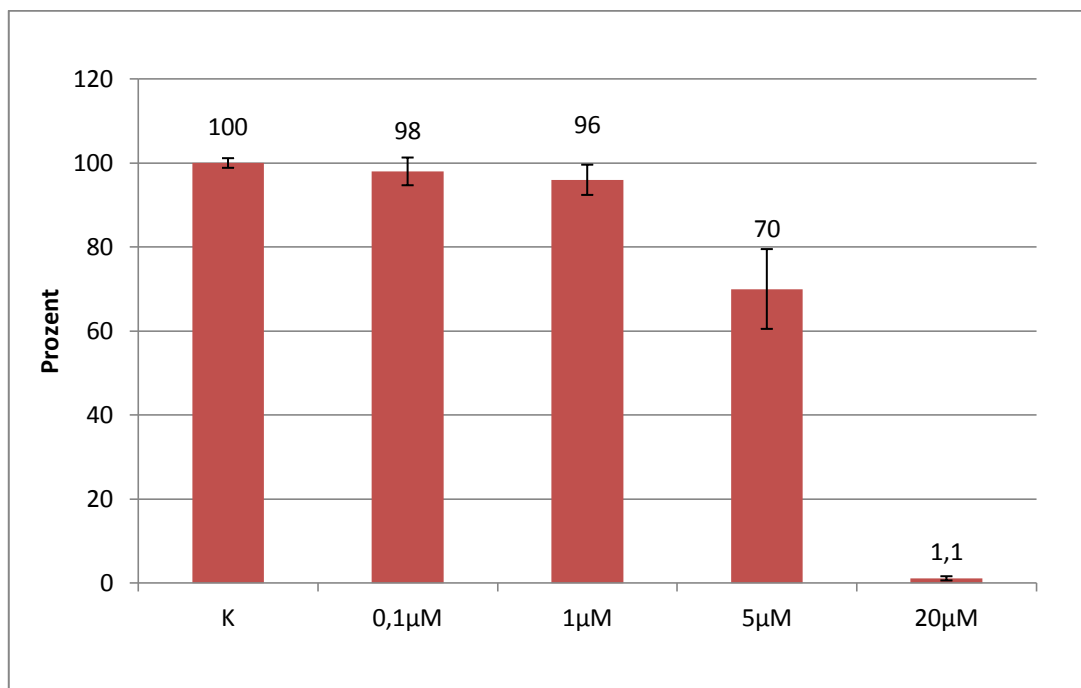


Abbildung 12: Ergebnisse des Viability Assays WST-1 der Zelllinie 786-O in Zellzahl $2,5 \times 10^3$ /Well unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen (K= unbehandelte Kontrolle)

Bei einer Sunitinib-Konzentration von 0,1 μ M beträgt die Viability bei den Zellen mit der höheren Ausgangszellzahl von $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle noch 98 Prozent, bei 1 μ M der Substanz noch 96 Prozent (vgl. Abbildung 12). Bei einer Konzentration des Sunitinib von 5 μ M reagieren die behandelten Zellen mit einer Reduktion der Zellvitalität auf 70 Prozent gegenüber der

Kontrolle. Bei einer Dosis von 20 μM Sunitinib sind nahezu keine vitalen Zellen mehr zu detektieren (1,2 Prozent verglichen mit der Kontrolle).

Anhand der Ergebnisse der oben erläuterten Versuche wurde für die Zelllinie 786-O ein IC_{50} -Wert von 6 μM Sunitinib definiert (bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte).

5.1.2 Antiproliferativer Effekt von Sunitinib auf A-498 und IC_{50} -Wert

Ausgangszellzahl $1 \times 10^3/\text{Well}$

Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des Viability Assays WST-1 zur Ermittlung des IC_{50} -Wertes für die Zelllinie A-498 mit einer Zellzahl von 1×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen sind in Tabelle 13 aufgeführt. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Tabelle 13: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays der Zelllinie A-498 in Zellzahl $1 \times 10^3/\text{Well}$ unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; p= Passage)

	A-498 p26	A-498 p27	A-498 p28	A-498 p29	A-498 p37
K	1,61 ($\pm 0,06$)	3,05 ($\pm 0,09$)	3,1 ($\pm 0,14$)	2,64 ($\pm 0,09$)	2,91 ($\pm 0,2$)
0,1μM	1,51 ($\pm 0,03$)	2,99 ($\pm 0,07$)	2,97 ($\pm 0,11$)	---	---
1μM	1,29 ($\pm 0,04$)	2,54 ($\pm 0,1$)	2,64 ($\pm 0,06$)	2,07 ($\pm 0,04$)	2,52 ($\pm 0,06$)
2μM	---	---	---	---	2,02 ($\pm 0,08$)
3μM	---	---	---	---	1,9 ($\pm 0,07$)
4μM	---	---	---	---	1,56 ($\pm 0,08$)
5μM	0,66 ($\pm 0,08$)	1,35 ($\pm 0,06$)	1,63 ($\pm 0,03$)	1,41 ($\pm 0,05$)	1,17 ($\pm 0,05$)
20μM	0,01 (± 0)	0,02 ($\pm 0,01$)	0,06 ($\pm 0,01$)	---	---

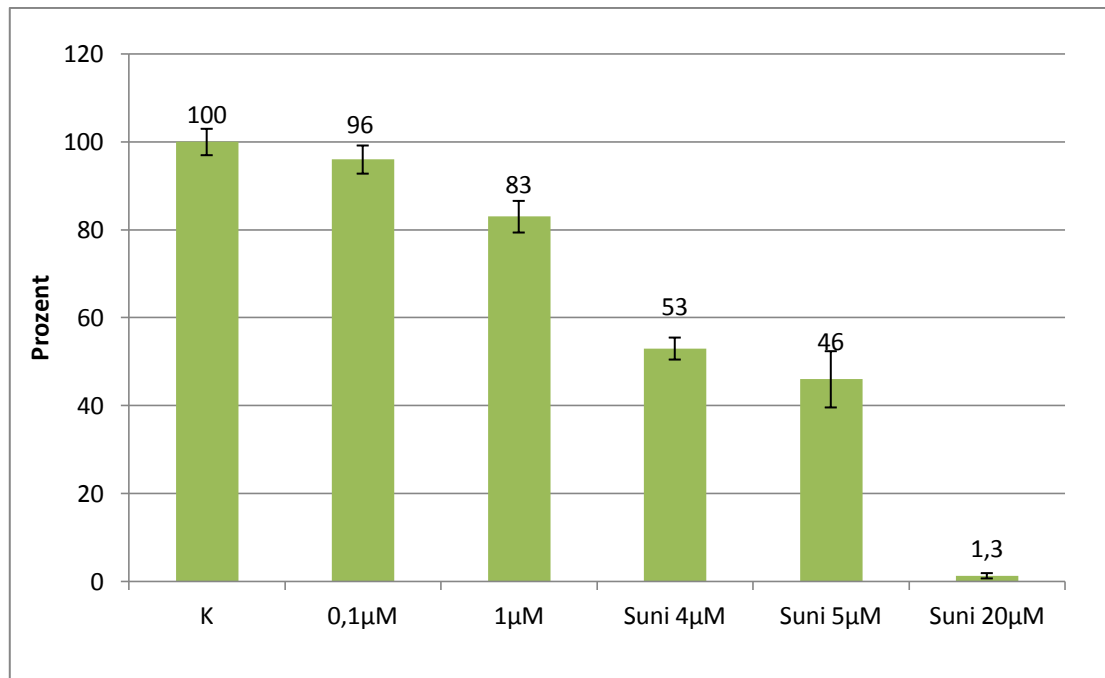


Abbildung 13: Ergebnisse des Viability Assays WST-1 der Zelllinie A-498 in Zellzahl 1×10^3 unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen (K= unbehandelte Kontrolle)

Bei der Zelllinie A-498 (Ausgangszellzahl 1×10^3 /Well) ist bei einer Sunitinib-Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ eine Verminderung der Viability auf 96 Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle festzustellen (s. Abbildung 13). Bei $1 \mu\text{M}$ der Substanz zeigt sich eine auf 83 Prozent reduzierte Zellvitalität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei einer Sunitinib-Konzentration von $4 \mu\text{M}$ sind nur noch um die 50 Prozent vitale Zellen nachzuweisen. Bei der hohen Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors von $20 \mu\text{M}$ sind nahezu keine vitalen Zellen mehr zu detektieren (1,3 Prozent im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle).

Ausgangszellzahl $2,5 \times 10^3$ /Well

Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des Viability Assays WST-1 für die Zelllinie A-498 mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse in Prozent verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Tabelle 14: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des Viability Assays WST-1 der Zelllinie A-498 in Zellzahl $2,5 \times 10^3$ /Well unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; p= Passage)

	A-498 p26	A-498 p27	A-498 p28
K	2,95 ($\pm 0,06$)	3,51 ($\pm 0,06$)	3,58 ($\pm 0,07$)
0,1 μM	2,83 ($\pm 0,03$)	3,37 ($\pm 0,08$)	3,53 ($\pm 0,08$)
1 μM	2,9 ($\pm 0,08$)	3,22 ($\pm 0,12$)	3,46 ($\pm 0,12$)
5 μM	1,55 ($\pm 0,03$)	2,63 ($\pm 0,03$)	2,61 ($\pm 0,04$)
20 μM	0,23 ($\pm 0,02$)	0,04 ($\pm 0,006$)	0,1 ($\pm 0,006$)

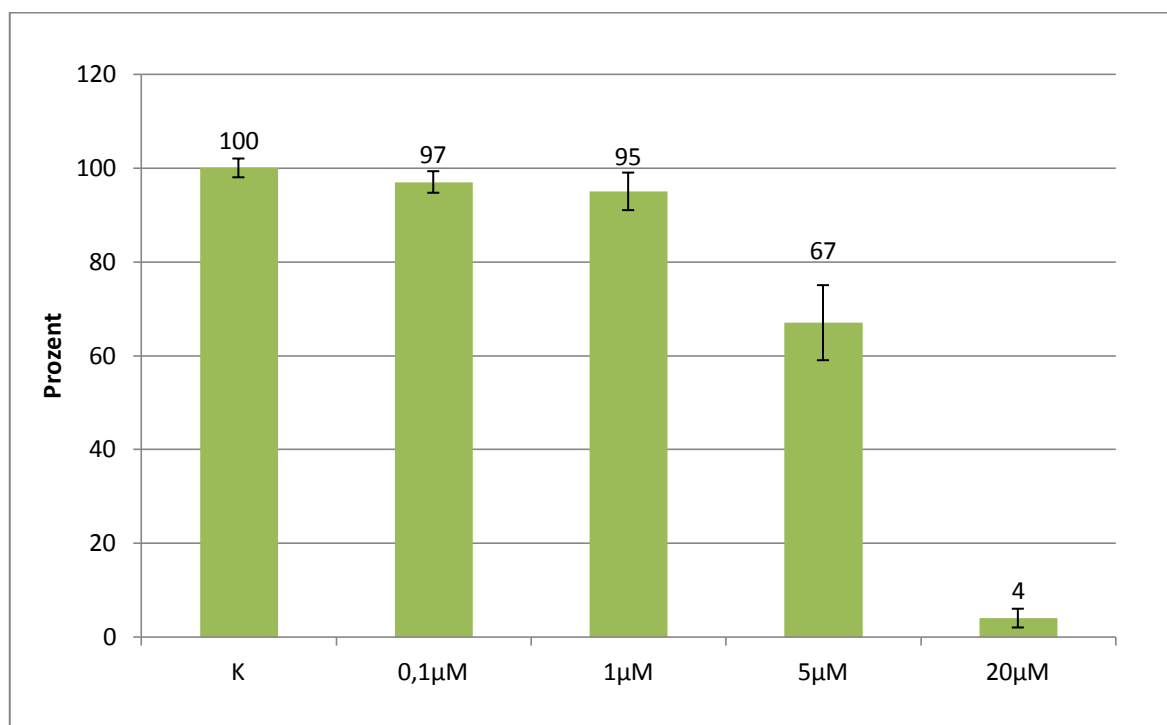


Abbildung 14: Ergebnisse des Viability Assays WST-1 der Zelllinie A-498 in Zellzahl $2,5 \times 10^3$ unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen (K= unbehandelte Kontrolle)

Die niedrige Sunitinib-Konzentration von 0,1 μ M führt bei einer Ausgangszellzahl von $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte zu einer Reduktion der Viability auf 97 Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle (s. Abbildung 14). Auch bei einer Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors von 1 μ M beträgt die Viability noch 95 Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Dosis von 5 μ M des Sunitinib bewirkt eine

Verminderung der Zellvitalität auf 67 Prozent gegenüber der nicht mit der Substanz behandelten Kontrolle. Bei einer Substanzkonzentration von 20 µM können noch 4 Prozent vitale Zellen detektiert werden.

Anhand dieser Ergebnisse wurde für die Zelllinie A-498 ein IC₅₀-Wert von 4µM Sunitinib definiert (bei einer Ausgangszellzahl von 1x10³ Zellen/Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte).

5.1.3 Antiproliferativer Effekt von Sunitinib auf CAKI-1 und IC₅₀-Wert

Ausgangszellzahl 1x10³/Well

Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des Viability Assays WST-1 zur Ermittlung eines IC₅₀-Wertes für die Zelllinie CAKI-1 mit einer Zellzahl von 1x10³ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen sind in Tabelle 15 aufgeführt. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse in Prozent verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Tabelle 15: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays der Zelllinie CAKI-1 in Zellzahl 1x10³/Well unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; p= Passage)

	CAKI-1 p17	CAKI-1 p21	CAKI-1 p22
K	2,97 (± 0,07)	3,51 (± 0,07)	3,55 (± 0,08)
0,1µM	2,98 (± 0,05)	---	---
1µM	2,79 (± 0,05)	3,3 (± 0,03)	---
2,5µM	---	2,57 (± 0,07)	---
5µM	1,41 (± 0,09)	1,64 (± 0,08)	1,94 (± 0,12)
7µM	---	---	0,74 (± 0,04)
10µM	---	---	0,06 (± 0,01)
20µM	0,03 (± 0,01)	---	---

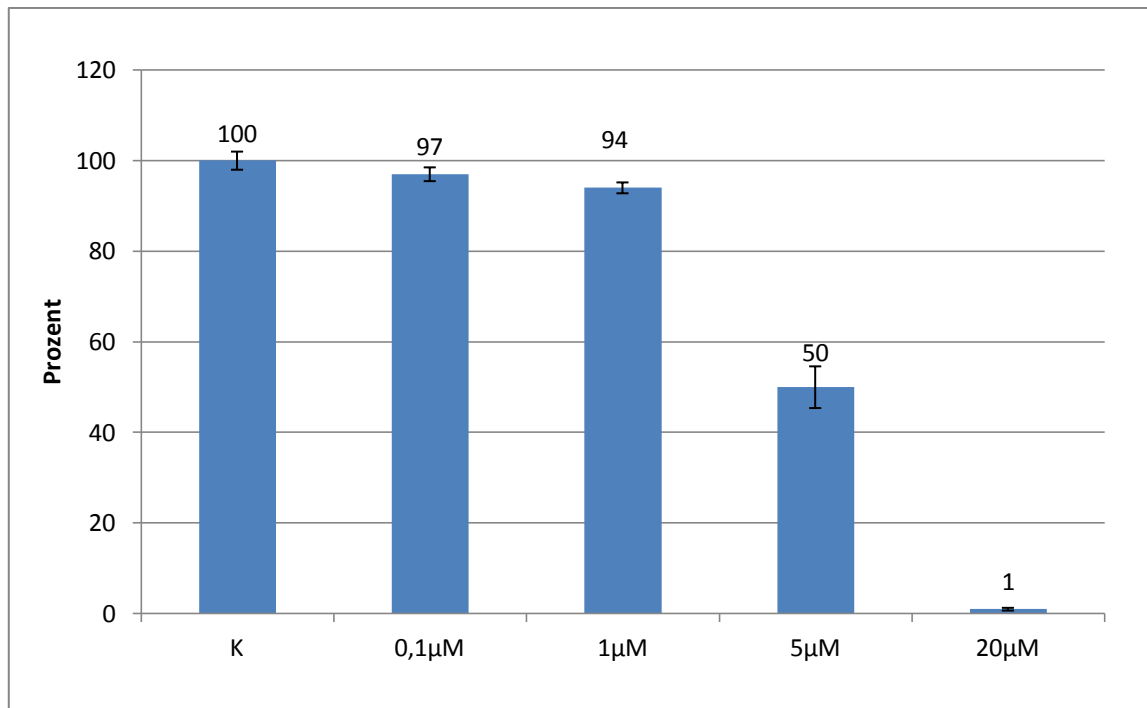


Abbildung 15: Ergebnisse des Viability Assays WST-1 der Zelllinie CAKI-1 in Zellzahl 1×10^3 unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen (K= unbehandelte Kontrolle)

Die Zelllinie CAKI-1 reagiert (bei einer Zellzahl von 1×10^3 Zellen pro Well) auf die Dosis von 0,1 µM Sunitinib mit einer Verringerung der Viability auf 97 Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle (vgl. Abbildung 15). Bei einer Konzentration der Substanz von 1 µM erkennt man eine Verringerung auf 94 Prozent. Wird der Tyrosinkinase-Inhibitor mit 5 µM dosiert, sind nur noch 50 Prozent vitale Zellen zu detektieren. Bei der hohen Dosierung von 20 µM sind wiederum nahezu keine vitalen Zellen mehr nachzuweisen (1 Prozent verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen).

Ausgangszellzahl $2,5 \times 10^3$ /Well

Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des Viability Assays WST-1 für die Zelllinie CAKI-1 mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen sind in Tabelle 16 aufgeführt. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Tabelle 16: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays der Zelllinie CAKI-1 in Zellzahl $2,5 \times 10^3$ /Well unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; p= Passage)

	CAKI-1 p17
K	3,43 ($\pm 0,04$)
1μM	3,05 ($\pm 0,06$)
5μM	2,1 ($\pm 0,07$)
20μM	0,09 ($\pm 0,01$)

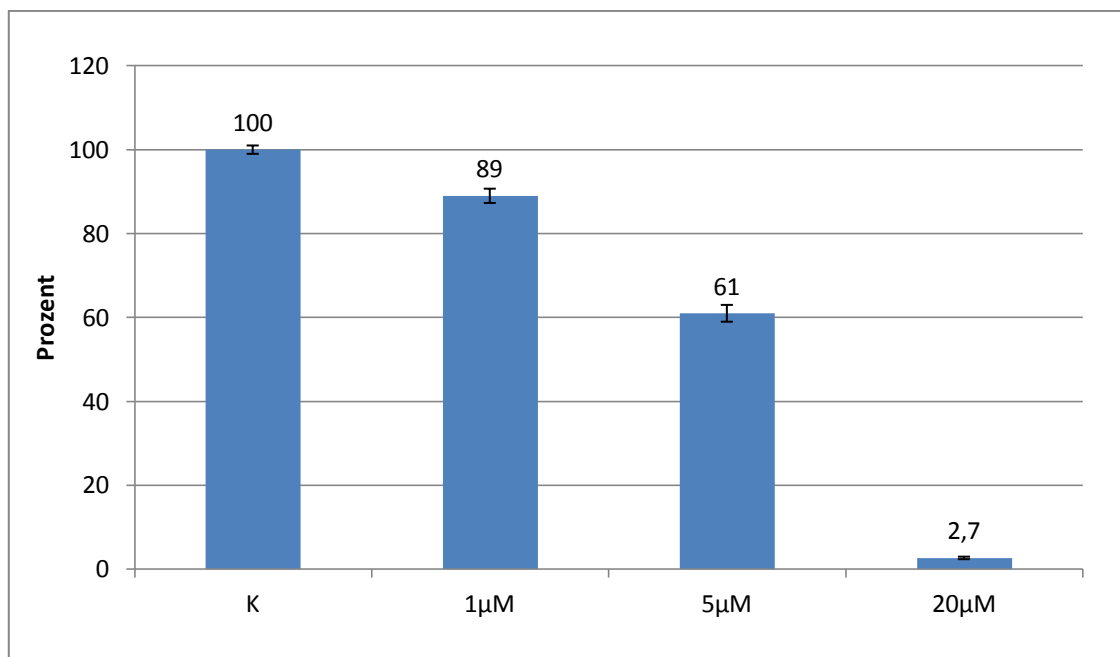


Abbildung 16: Ergebnisse des Viability Assays WST-1 der Zelllinie CAKI-1 in Zellzahl $2,5 \times 10^3$ unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen (K= unbehandelte Kontrolle)

Beträgt die Ausgangszellzahl $2,5 \times 10^3$ pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte, zeigt sich bei einer Sunitinib-Konzentration von 1 μ M eine Reduktion der Viability auf 89 Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle (vgl. Abbildung 16). Bei einer Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors von 5 μ M ist der Anteil an vitalen Zellen noch 61 Prozent gegenüber der nicht behandelten Kontrolle. Die hohe Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors (20 μ M) bewirkt eine Reduktion der Viability auf 2,7 Prozent.

Anhand dieser Ergebnisse wurde für die Zelllinie CAKI-1 ein IC₅₀-Wert von 5 µM Sunitinib definiert (bei einer Ausgangszellzahl von 1x10³ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte).

5.1.4 Antiproliferativer Effekt von Sunitinib auf CAKI-2 und IC₅₀-Wert

Ausgangszellzahl 1x10³/Well

Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des Viability Assays WST-1 zur Ermittlung eines IC₅₀-Wertes für die Zelllinie CAKI-2 mit einer Zellzahl von 1x10³ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen sind in Tabelle 17 aufgeführt. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse in Prozent verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Tabelle 17: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays der Zelllinie CAKI-2 in Zellzahl 1x10³/Well unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; p= Passage)

	CAKI-2 p17	CAKI-2 p19	CAKI-2 p20	CAKI-2 p21	CAKI-2 p23	CAKI-2 p33
K	1,8 (± 0,06)	1,86 (± 0,09)	1,94 (± 0,03)	2,4 (± 0,07)	2,5 (± 0,08)	2,08 (± 0,08)
0,1µM	1,9 (± 0,03)	1,84 (± 0,04)	1,92 (± 0,09)	2,31 (± 0,1)	---	---
1µM	1,78 (± 0,06)	1,84 (± 0,01)	1,83 (± 0,08)	2,32 (± 0,03)	2,31 (± 0,02)	---
5µM	1,23 (± 0,03)	0,98 (± 0,02)	1,41 (± 0,07)	1,3 (± 0,05)	1,72 (± 0,03)	1,38 (± 0,06)
6µM	---	---	---	---	1,28 (± 0,05)	1,09 (± 0,04)
7µM	---	---	---	---	---	0,74 (± 0,06)
8µM	---	---	---	---	---	0,44 (± 0,05)
9µM	---	---	---	---	---	0,17 (± 0,03)
10µM	---	---	---	---	---	0,03 (± 0,01)
20µM	---	0,02 (± 0,01)	0,03 (± 0,01)	0,05 (± 0,01)	---	---

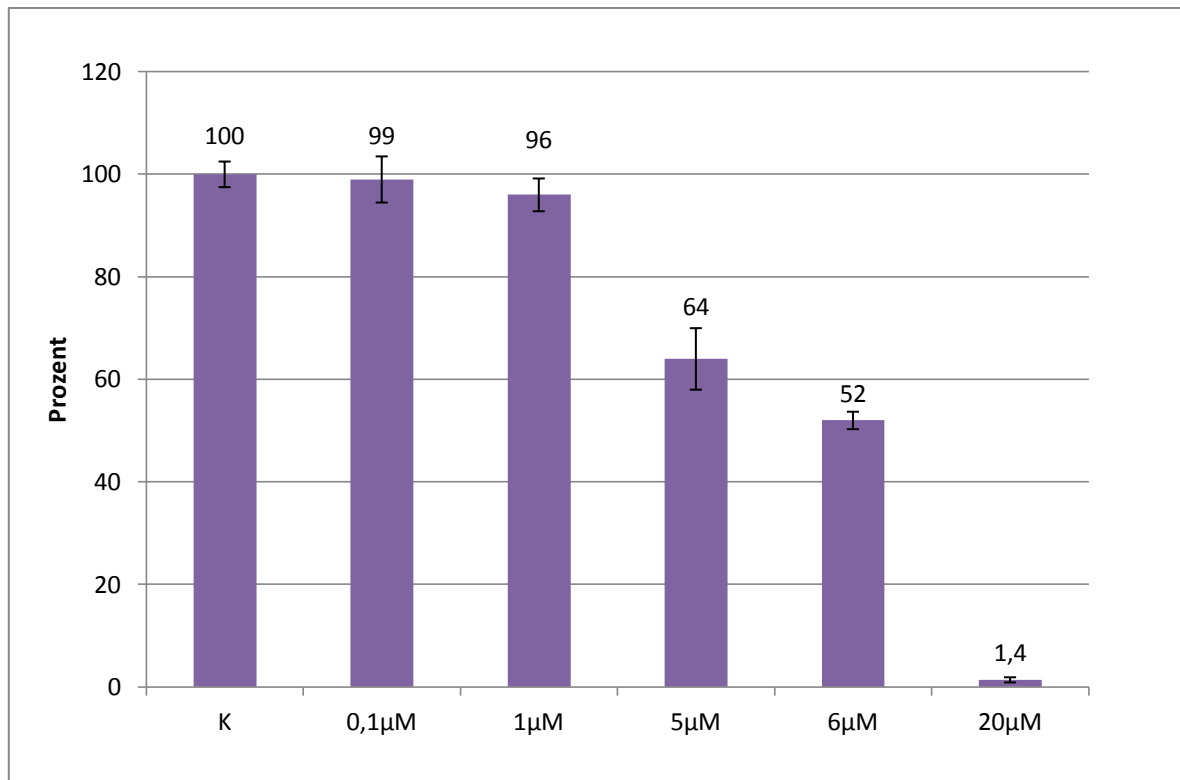


Abbildung 17: Ergebnisse des Viability Assays WST-1 der Zelllinie CAKI-2 in Zellzahl 1×10^3 unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen (K= unbehandelte Kontrolle)

Die Zelllinie CAKI-2 reagiert auf die niedrigen Sunitinib-Konzentrationen 0,1µM und 1µM (bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^3 Zellen pro Well) mit einer Reduktion der Zellvitalität auf 99 Prozent bzw. 96 Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle (s. Abbildung 17). Bei einer Konzentration von 5 µM der Substanz sind noch 64 Prozent vitale Zellen nachweisbar, bei einer Konzentration von 6 µM noch circa 50 Prozent. Bei einer Konzentration von 20 µM des Tyrosinkinase-Inhibitors sind quasi keine vitalen Zellen mehr detektierbar (1,4 Prozent verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen).

Ausgangszellzahl $2,5 \times 10^3$ /Well

Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des Viability Assays WST-1 für die Zelllinie CAKI-2 mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen sind in Tabelle 18 aufgeführt. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse in Prozent verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Tabelle 18: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays der Zelllinie CAKI-2 in Zellzahl $2,5 \times 10^3$ /Well unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; p= Passage)

	CAKI-2 p17	CAKI-2 p19	CAKI-2 p20	CAKI-2 p21
K	2,75 ($\pm 0,03$)	1,71 ($\pm 0,06$)	1,7 ($\pm 0,07$)	2,67 ($\pm 0,05$)
0,1 μM	2,67 ($\pm 0,07$)	1,72 ($\pm 0,03$)	1,61 ($\pm 0,01$)	2,52 ($\pm 0,02$)
1 μM	2,61 ($\pm 0,07$)	1,66 ($\pm 0,03$)	1,6 ($\pm 0,07$)	2,61 ($\pm 0,04$)
5 μM	2,12 ($\pm 0,07$)	1,43 ($\pm 0,02$)	1,35 ($\pm 0,03$)	2,1 ($\pm 0,03$)
20 μM	---	0,01 ($\pm 0,01$)	0,03 ($\pm 0,01$)	0,04 (± 0)

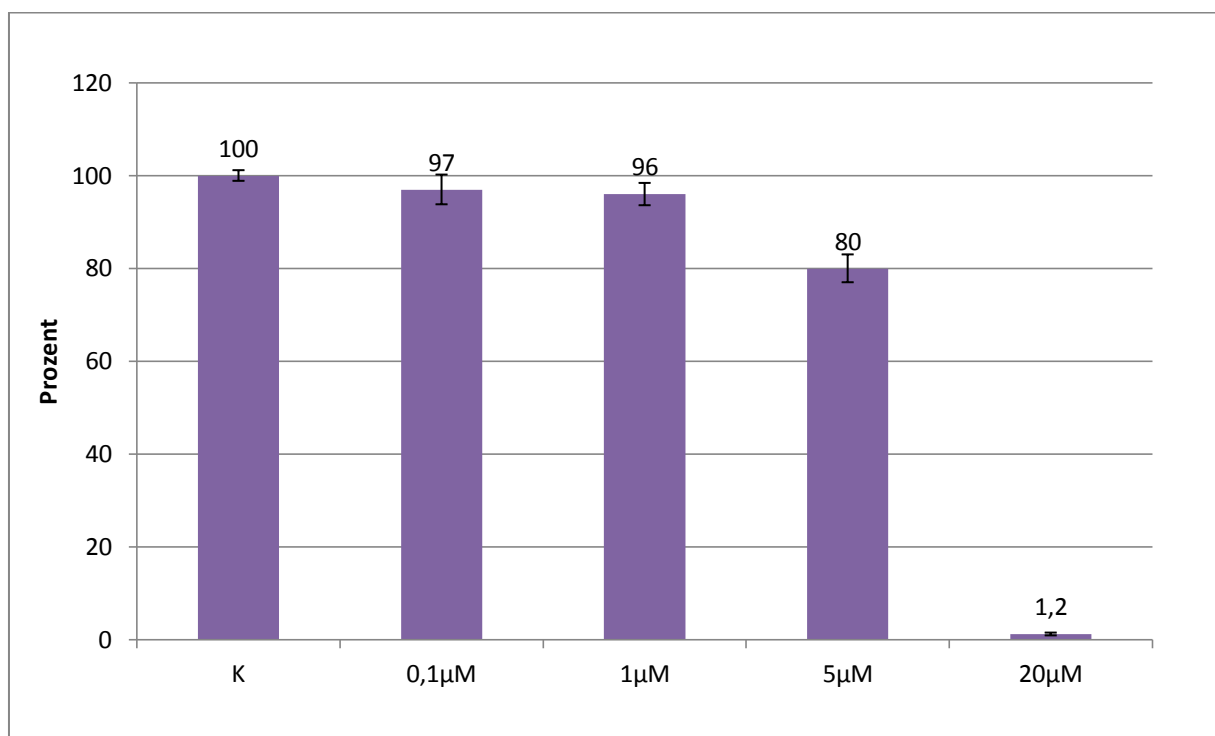


Abbildung 18: Ergebnisse des Viability Assays WST-1 der Zelllinie CAKI-2 in Zellzahl $2,5 \times 10^3$ unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen (K= unbehandelte Kontrolle)

Die Sunitinib-Konzentrationen 0,1 μ M und 1 μ M führen bei einer Ausgangszellzahl von $2,5 \times 10^3$ CAKI-2-Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte zu einer Reduktion der Viability auf 97 beziehungsweise 96 Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (vgl. Abbildung 18). Bei einer Substanzkonzentration von 5 μ M kann eine Verminderung der Viability auf 80 Prozent festgestellt werden. Bei einer hohen

Konzentration des Sunitinib von 20 μM können 1,6 Prozent vitale Zellen im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollzellen detektiert werden.

Anhand dieser Ergebnisse wurde für die Zelllinie CAKI-2 ein IC_{50} -Wert von 6 μM Sunitinib definiert (bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^3 Zellen).

Tabelle 19 fasst die IC_{50} -Werte der vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien noch einmal zusammen:

Tabelle 19: Übersicht über die IC_{50} -Werte der einzelnen Nierenzellkarzinom-Zelllinien

Nierenzellkarzinom-Zelllinie	IC_{50} -Wert [μM]
786-O	6
A-498	4
CAKI-1	5
CAKI-2	6

Tabelle 20 fasst die unterschiedlich ausgeprägte Reduktion der Viability unter Sunitinib-Behandlung bei verschiedenen Ausgangszellzahlen (1×10^3 Zellen pro Well, $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well) bei den vier getesteten Nierenzellkarzinom-Zelllinien zusammen:

Tabelle 20: Vergleich der Reduktion der Viability unter Sunitinib-Behandlung in der Konzentration 5 μM zwischen den verschiedenen Ausgangszellzahlen (1×10^3 Well, $2,5 \times 10^3$ /Well)

Nierenzellkarzinom-Zelllinie	Reduktion der Viability im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter Sunitinib 5 μM [in %]	
	<i>Ausgangszellzahl 1×10^3 Zellen/ Well</i>	<i>Ausgangszellzahl $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well</i>
786-O	42,4	31
A-498	54	33
CAKI-1	50	39
CAKI-2	36	20

5.1.5 Durchführung des Cytotoxicity Detection LDH Plus Assays, des Cell Death Detection ELISA Plus Assays und des Cell Proliferation ELISA Assays (BrdU)

Nachdem bei den vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien 786-O, A-498, CAKI-1 und CAKI-2 die IC_{50} -Werte definiert wurden, wurden drei Zelllinien in die engere Auswahl für die Langzeitbehandlung mit Sunitinib genommen (786-O, A-498 und CAKI-2). An diesen drei Zelllinien wurden weitere Assays durchgeführt: der Cytotoxicity Detection LDH plus Assay, der Cell Death Detection ELISA plus (CDD+)-Assay sowie der Cell Proliferation ELISA (BrdU). Ziel dieser Versuche war es festzustellen, ob Sunitinib in den Tumorzellen möglicherweise eine erhöhte Nekrose oder eine Induktion der Apoptose verursacht bzw. die Proliferation beeinflusst. Mit diesen Erkenntnissen sollte es dann auch möglich sein, einen weiteren Assay zum besseren Monitoring einer möglichen Resistenzentwicklung einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie unter der permanenten Behandlung mit Sunitinib zu finden (neben den Viability Assays WST-1 und XTT). Zur Durchführung der Assays wurden bei allen Zellen jeweils Sunitinib-Konzentrationen von 1 μ M und 5 μ M verwendet, die Ausgangszellzahl betrug 1×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte.

Cytotoxicity Detection LDH plus

In Tabelle 21 sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des Cytotoxicity Detection LDH plus für die einzelnen Nierenzellkarzinom-Zelllinien aufgeführt. Die Standardabweichung befindet sich jeweils in Klammern darunter. Die Positivkontrolle (K+) wurde zusätzlich mit aufgeführt, um zu verdeutlichen, wie hoch der Absorptionswert ist, wenn die gesamte intrazelluläre LDH durch Zelllyse freigesetzt wird, was einer Nekrose aller im Well befindlichen Zellen bedeuten würde. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse in Prozent.

Tabelle 21: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 492 nm) des Cytotoxicity Detection LDH plus bei den Zelllinien 786-O, A-498 und CAKI-2 unter Behandlung mit 1 μ M und 5 μ M Sunitinib; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; K+= Positivkontrolle/ high control; p= Passage)

	786-O p25	A-498 p29	CAKI-2 p23
K+	2,38 (\pm 0,08)	1,5 (\pm 0,08)	3,58 (\pm 0,09)
K	0,45 (\pm 0,05)	0,36 (\pm 0,03)	0,63 (\pm 0,04)
1μM	0,58 (\pm 0,03)	0,45 (\pm 0,02)	0,68 (\pm 0,03)
5μM	0,48 (\pm 0,02)	0,43 (\pm 0,02)	0,31 (\pm 0,02)

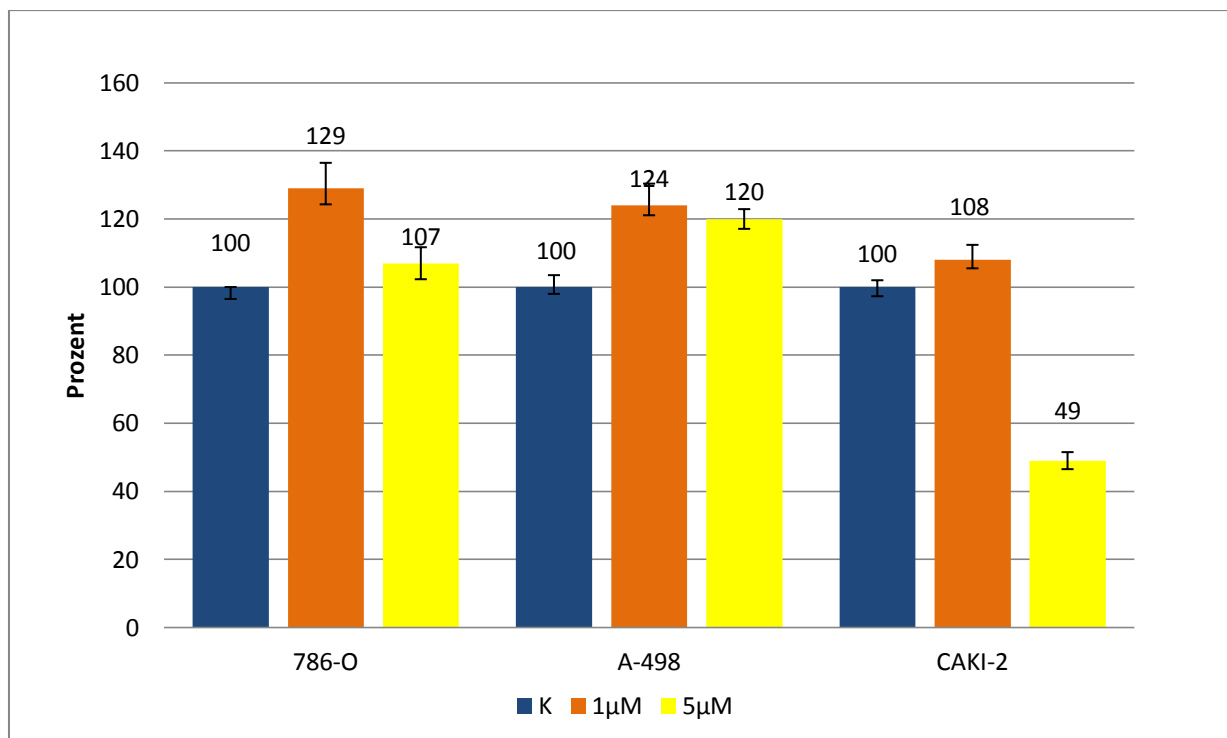


Abbildung 19: Ergebnisse des Cytotoxicity Detection LDH plus bei den Zelllinien 786-O, A-498 und CAKI-2 unter Behandlung mit 1 μ M und 5 μ M Sunitinib (K= unbehandelte Kontrolle)

Bei den mit 1 μ M Sunitinib behandelten Zellen der Zelllinie 786-O beträgt der Anteil von freigesetztem LDH 129 Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (vgl. Abbildung 19). Bei den mit Sunitinib 5 μ M behandelten Zellen liegt der messbare LDH-Gehalt verglichen mit der unbehandelten Kontrolle bei 107 Prozent.

Die Zelllinie A-498 zeigt bei einer Sunitinib-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine LDH-Freisetzung von 124 Prozent (vgl. Abbildung 20). Der LDH-Gehalt bei den mit 5 μ M des Tyrosinkinase-Inhibitors behandelten Zellen beträgt 120 Prozent im verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Bei der Zelllinie CAKI-2 beträgt die LDH-Freisetzung bei den mit Sunitinib 1 μ M behandelten Zellen 108 Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei einer Konzentration von 5 μ M des Tyrosinkinase-Inhibitors können noch 49 Prozent des LDH-Gehaltes verglichen mit der unbehandelten Kontrolle gemessen werden.

Cell Death Detection ELISA plus (CDD+)

In Tabelle 22 sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte im Rahmen des Cell Death Detection ELISA plus für die einzelnen Nierenzellkarzinom-Zelllinien aufgeführt. Die Standardabweichung befindet sich jeweils in Klammern darunter. Die Positivkontrolle (K+) wurde zusätzlich mit aufgeführt, um zu verdeutlichen, wie hoch der Absorptionswert des konzentrierten Histonkomplexes gegenüber denen der unbehandelten und behandelten Zellen ist. Ähnlich hohe Werte würden eine hohe Rate an apoptotischen Zellen bedeuten.

Tabelle 22: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 405 nm) des Cell Death Detection LDH plus bei den Zelllinien 786-O, A-498 und CAKI-2 unter Behandlung mit 1 μ M und 5 μ M Sunitinib; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; K+= Positivkontrolle; p= Passage)

	786-O p24	A-498 p28	CAKI-2 p22
K+	1,99 (\pm 0,04)	1,99 (\pm 0,04)	1,99 (\pm 0,04)
K	0,44 (\pm 0,08)	0,23 (\pm 0,08)	1,14 (\pm 0,02)
1μM	0,31 (\pm 0,04)	0,28 (\pm 0,01)	1,18 (\pm 0,02)
5μM	0,48 (\pm 0,03)	0,22 (\pm 0,02)	0,3 (\pm 0,01)

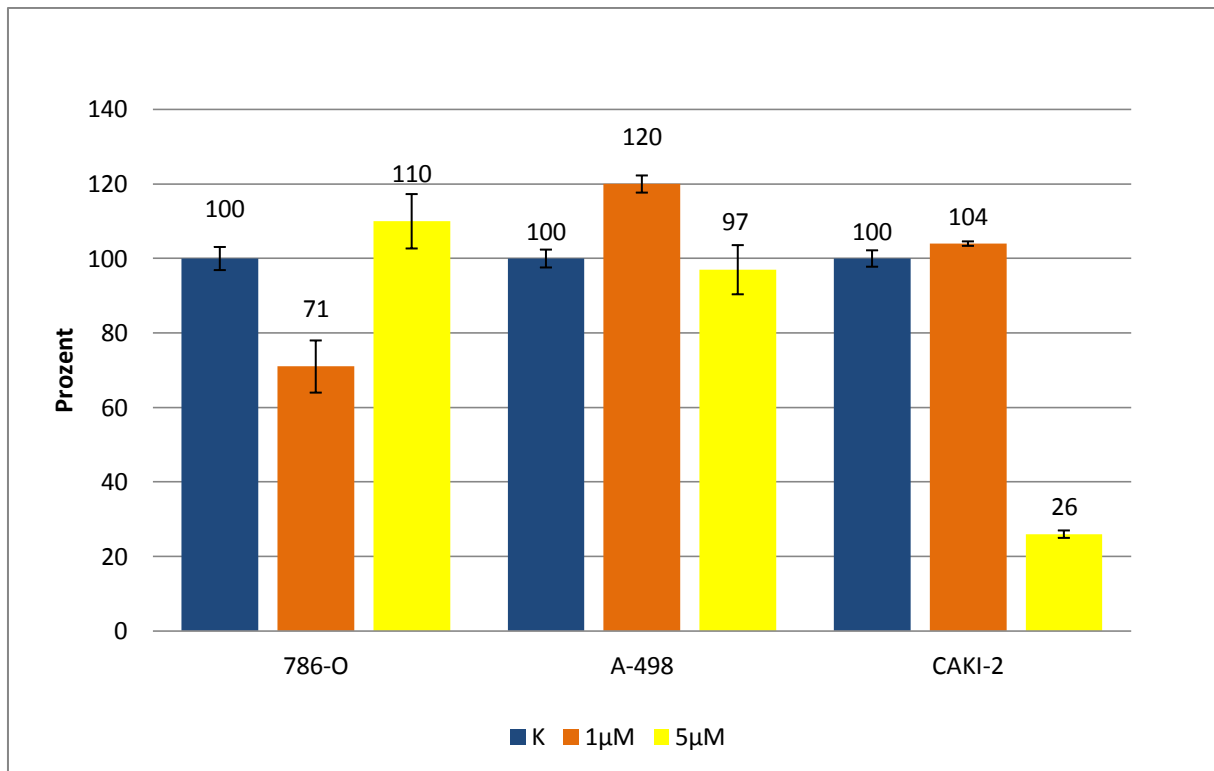


Abbildung 20: Ergebnisse des Cell Death Detection ELISA plus bei den Zelllinien 786-O, A-498 und CAKI-2 unter Behandlung mit 1 μM und 5 μM Sunitinib

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle können bei der Zelllinie 786-O bei einer Sunitinib-Konzentration von 1 μM 71 Prozent Histonkörper nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 20). In den Wells der mit Sunitinib 5 μM beträgt der Gehalt an Histonkörpern 110 Prozent verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen.

Bei der Zelllinie A-498 kann bei den mit 1 μM Sunitinib behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein Histongehalt von 120 Prozent detektiert werden (s. Abbildung 20). Bei einer Konzentration von 5 μM des Tyrosinkinase-Inhibitors liegt der Prozentsatz bei 97 Prozent verglichen mit der Kontrolle.

Die mit Sunitinib 1 μM behandelten CAKI-2-Zellen weisen einen Histongehalt von 104 Prozent verglichen mit der unbehandelten Kontrolle auf (s. Abbildung 20). Bei einer Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors von 5 μM Zellen sind nur noch 26 Prozent Histonkörper im Vergleich zu den Kontrollzellen festzustellen.

Cell Proliferation ELISA (BrdU)

Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte für die einzelnen Nierenzellkarzinom-Zelllinien im Rahmen des Cell Proliferation ELISA (BrdU) sind in Tabelle 23 ersichtlich. Die Standardabweichung befindet sich jeweils in Klammern darunter.

Tabelle 23: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des Cell Proliferation ELISA (BrdU) bei den Zelllinien 786-O, A-498 und CAKI-2 unter Behandlung mit 1 μ M und 5 μ M Sunitinib; Standardabweichung in Klammern darunter (K= unbehandelte Kontrolle; p= Passage)

	786-O p24	A-498 p28	CAKI-2 p22
K	3,48 (\pm 0,06)	2,16 (\pm 0,09)	2,38 (\pm 0,07)
1μM	3,2 (\pm 0,05)	1,77 (\pm 0,06)	2,37 (\pm 0,03)
5μM	1,02 (\pm 0,02)	0,67 (\pm 0,06)	1,56 (\pm 0,01)

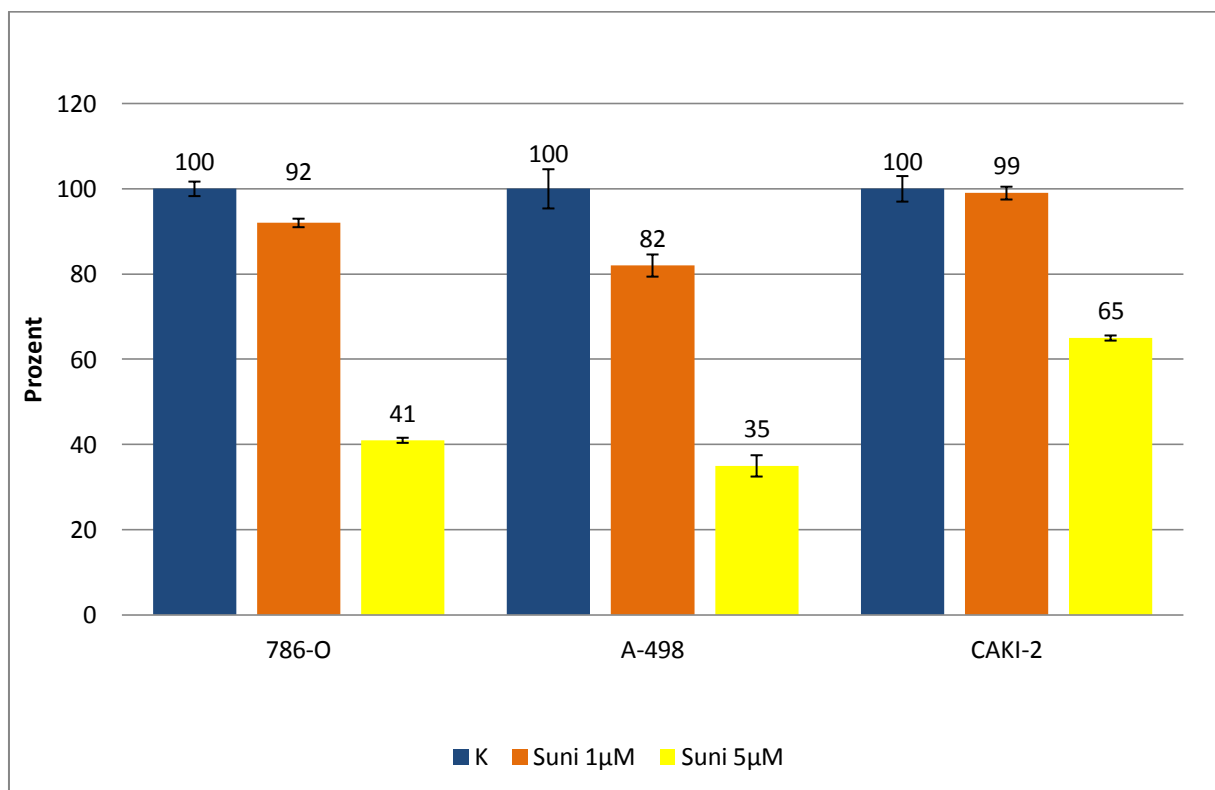


Abbildung 21: Ergebnisse des Cell Proliferation ELISA (BrdU) bei den Zelllinien 786-O, A-498 und CAKI-2 unter Behandlung mit 1 μ M und 5 μ M Sunitinib (K= unbehandelte Kontrolle)

Bei der Zelllinie 786-O beträgt der Anteil des BrdU bei einer Sunitinib-Konzentration von 1 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 92 Prozent (vgl. Abbildung 21). Bei den Zellen, die einer Konzentration von 5 μM des Tyrosinkinase-Inhibitors ausgesetzt wurden, können noch 41 Prozent des BrdU (verglichen mit der unbehandelten Kontrolle) detektiert werden.

Bei der Zelllinie A-498 zeigt sich bei einer Sunitinib-Konzentration von 1 μM eine Verringerung des BrdU-Anteils auf 82 Prozent verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Der Anteil des in die DNA eingebauten BrdU beträgt bei einer Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors von 5 μM noch 35 Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.

Die Menge des BrdU in den mit Sunitinib 1 μM behandelten CAKI-2-Zellen ist mit 99 Prozent verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen nahezu gleich. Bei den Zellen, die mit einer Sunitinib in einer Dosis von 5 μM behandelt wurden, sinkt die Menge des BrdU auf 65 Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Die Ergebnisse dieses Assays zeigen, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib über eine Hemmung der Proliferation auf die Tumorzellen wirkt. Daher eignet sich der Cell Proliferation ELISA (BrdU), gemeinsam mit den Viability-Assays WST-1 und XTT, am besten zum Monitoring einer Resistenzentwicklung einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie unter Dauerbehandlung mit Sunitinib.

5.2 Etablierung einer auf Sunitinib resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie

Nach den oben durchgeführten Versuchen wurde zur Etablierung einer auf Sunitinib resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie die Zelllinie CAKI-2 ausgewählt. Hier betrug der IC_{50} -Wert 6 μ M Sunitinib. Es wurde entschieden, die Dauerbehandlung mit einer etwas niedrigeren Dosis, nämlich 5 μ M des Tyrosinkinase-Inhibitors, durchzuführen. Die Zellen waren zu Beginn des Versuches in Passage 24. Die Ausgangszellzahl betrug 3×10^4 Zellen pro Well einer 6-Well-Mikrotiterplatte. Eine Zellzählung erfolgte bei der Passagierung einmal wöchentlich, zu definierten Zeitpunkten wurde zusätzlich ein Viability Assay (XTT, WST-1; grüner Pfeil, Abbildung 22) und/ oder ein Proliferationsassay (BrdU; roter Pfeil, Abbildung 22) durchgeführt.

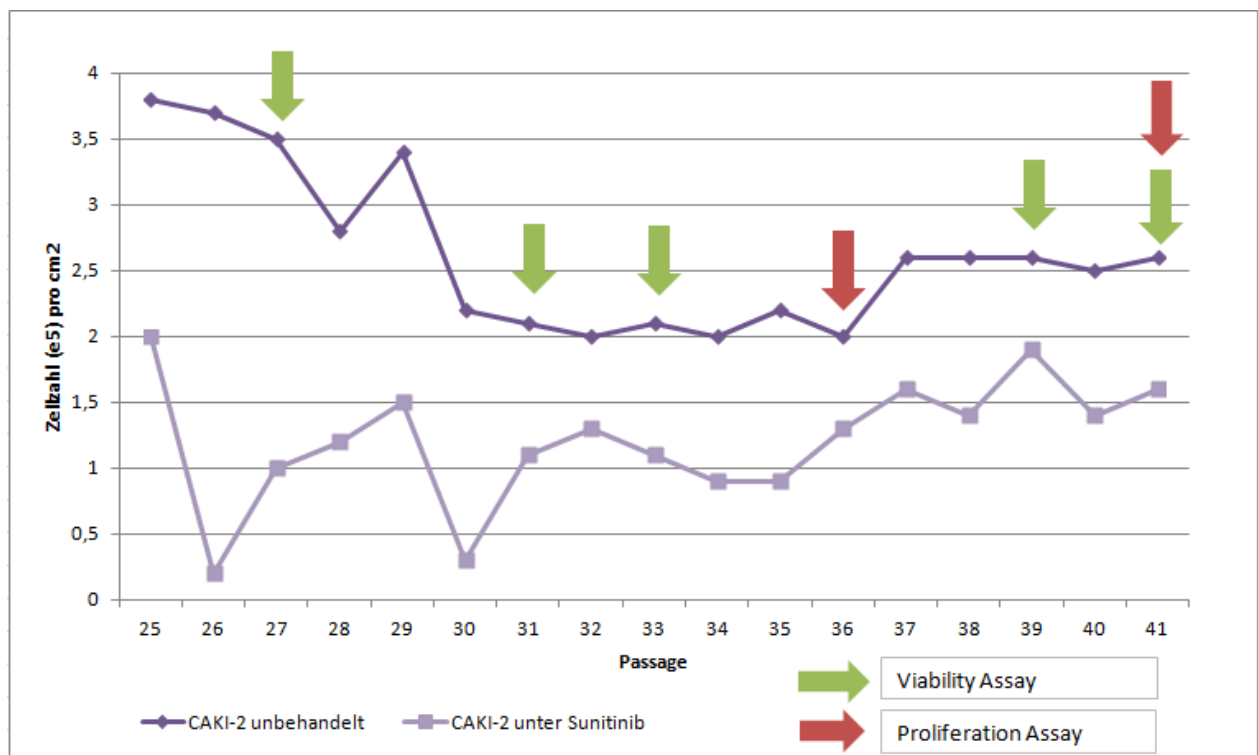


Abbildung 22: Verlauf der Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie CAKI-2

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der wöchentlichen Zellzählungen der unbehandelten Kontrollzellen sowie der permanent mit Sunitinib behandelten Zellen aufgeführt.

Tabelle 24: Ergebnisse der Zellzählung bei der Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie CAKI-2

Passage	Zellzahl ($\times 10^5$) pro cm^2	
	<i>CAKI-2 unbehandelt</i>	<i>CAKI-2 unter Sunitinib 5μM</i>
25	3,8	2
26	3,7	0,2
27	3,5	1
28	2,8	1,2
29	3,4	1,5
30	2,2	0,3
31	2,1	1,1
32	2	1,3
33	2,1	1,1
34	2	0,9
35	2,2	0,9
36	2	1,3
37	2,6	1,6
38	2,6	1,4
39	2,6	1,9
40	2,5	1,4
41	2,6	1,6

5.3 Charakterisierung von zellbiologischen Parametern unter der Therapie

5.3.1 Start der Langzeitkultur, Passage 25-30

Die CAKI-2-Zellen wurden initial mit gleicher Zellzahl pro Well ausgesät. Bei der ersten Zellzählung (Passage 25, vgl. Tabelle 24) zeigte sich bereits ein Unterschied im Wachstum zwischen den unbehandelten Kontrollzellen und der permanent mit Sunitinib behandelten Zellen. Die Zellzahl der unbehandelten Zellen war mit $3,8 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 fast doppelt so hoch wie die der Sunitinib-Zellen (2×10^5 Zellen pro cm^2). Bei der nächsten Passagierung (Passage 26) zeigte sich die Zellzahl der Kontrollzellen ähnlich wie bei der vorausgegangenen Zellzählung ($3,7 \times 10^5$ Zellen pro

cm²). Bei den Sunitinib-Zellen kam es jedoch zu einem Einbruch der Zellzahl auf nur noch $0,2 \times 10^5$ Zellen pro cm². Eine Woche später (Passage 27) betrug die Zellzahl 1×10^5 Zellen pro cm² bei den mit Sunitinib behandelten Zellen. Die Kontrollzellen blieben etwa auf dem gleichen Niveau ($3,5 \times 10^5$ Zellen pro cm²). Mit einem Teil der Zellen der Passage 27 wurde auch ein Viability Assay (XTT) durchgeführt.

In Tabelle 25 sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des XTT-Assays mit Zellen der Langzeitkultur aus Passage 27 ersichtlich. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse in Prozent.

Tabelle 25: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 492 nm) des XTT-Assays mit Zellen der Langzeitkultur aus Passage 27; Standardabweichung in Klammern darunter (K = unbehandelte Kontrolle; K+ Suni 5µM = Zellen der unbehandelten Kontrolle, die für die Dauer des Assays mit Sunitinib 5 µM behandelt wurden; LZK= Langzeitkultur; p= Passage)

	Absorptionswerte
K	1,78 (± 0,03)
K + Suni 5µM	1,23 (± 0,04)
Suni 5µM permanent	1,05 (± 0,03)

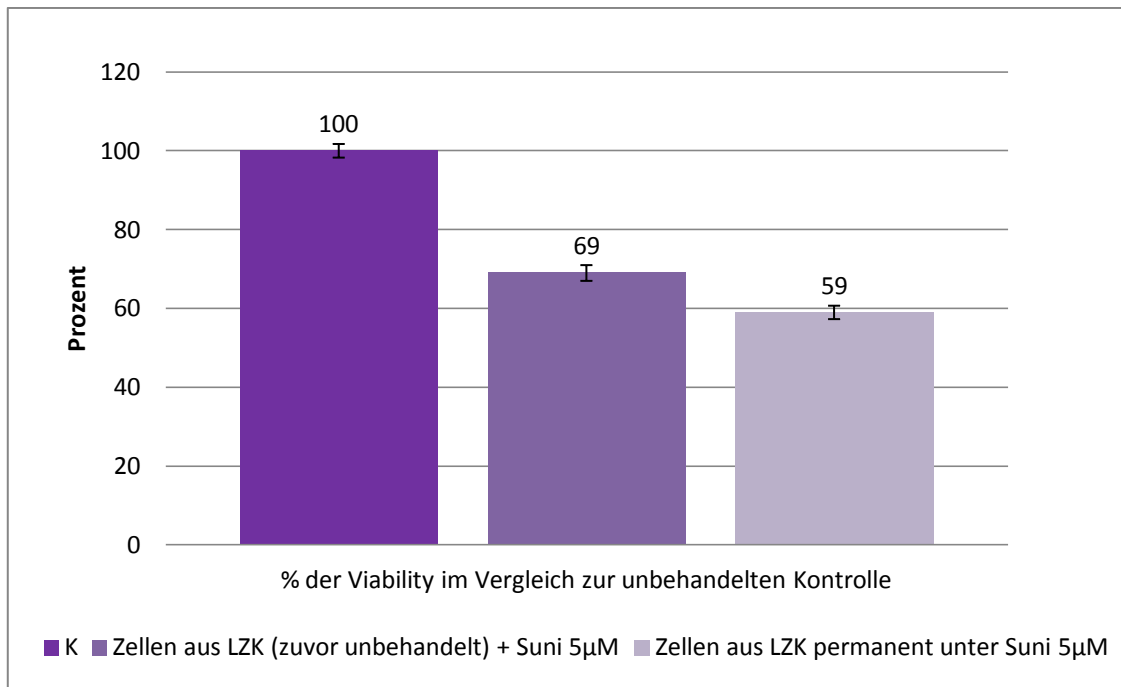


Abbildung 23: Ergebnisse des XTT Assays mit CAKI-2-Zellen aus der Langzeitkultur zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie, Passage 27 (K= unbehandelte Kontrolle; LZK = Langzeitkultur)

Die zuvor unbehandelten CAKI-2- Zellen, die für die Dauer des Assays mit Sunitinib 5 µM behandelt wurden, zeigen eine Reduktion der Viability auf 69 Prozent im Vergleich zu den stets unbehandelten Kontrollzellen (vgl. Abbildung 23). Bei denjenigen CAKI-2-Zellen, die unter permanentem Einfluss des Sunitinib in der Konzentration 5 µM standen, konnte eine Verminderung der Viability auf 59 Prozent im Vergleich zur stets unbehandelten Kontrolle festgestellt werden.

Bei der Zellzählung in Passage 28 war eine Zellzahl von $1,2 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 der mit Sunitinib dauerbehandelten CAKI-2-Zellen festzustellen während die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle $2,8 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 betrug (s. Tabelle 24). Bei der nächsten Zählung (Passage 29) war die Zahl wieder ähnlich dem ursprünglichen Niveau ($3,4 \times 10^5$ Zellen pro cm^2). Auch der positive Trend bei den permanent behandelten Zellen hielt mit einer Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 an. In Passage 30 kam es sowohl bei den Kontrollzellen ($2,2 \times 10^5$ Zellen pro cm^2) als auch bei den behandelten CAKI-2- Zellen ($0,3 \times 10^5$ Zellen pro cm^2) zu einem Abfall der Zellzahl.

5.3.2 Passage 31-35

Bei der Zellzählung der Passage 31 hielt sich die unbehandelte Kontrolle der CAKI-2-Zellen auf dem niedrigen Niveau der Vorwoche ($2,1 \times 10^5$ Zellen pro cm^2) (vgl. Tabelle 24). Bei den permanent behandelten Zellen wurde eine Zellzahl von $1,1 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 erhoben. Mit Zellen dieser Passage wurden wiederum ein Viability Assay (WST-1) durchgeführt.

Tabelle 26 zeigt die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des WST-1-Assays mit CAKI-2-Zellen der Langzeitkultur aus Passage 31. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse in Prozent.

Tabelle 26: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays mit Zellen der Langzeitkultur aus Passage 31 unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K = unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur; p= Passage)

	CAKI-2 aus LZK zuvor unbehandelt p31	CAKI-2 aus LZK permanent unter Suni 5μM p31
K	1,05 ($\pm 0,07$)	0,99 ($\pm 0,05$)
Suni 1μM	1,04 ($\pm 0,03$)	0,99 ($\pm 0,06$)
Suni 5μM	0,7 ($\pm 0,05$)	0,54 ($\pm 0,02$)
Suni 10μM	0,01 ($\pm 0,01$)	0,02 (± 0)

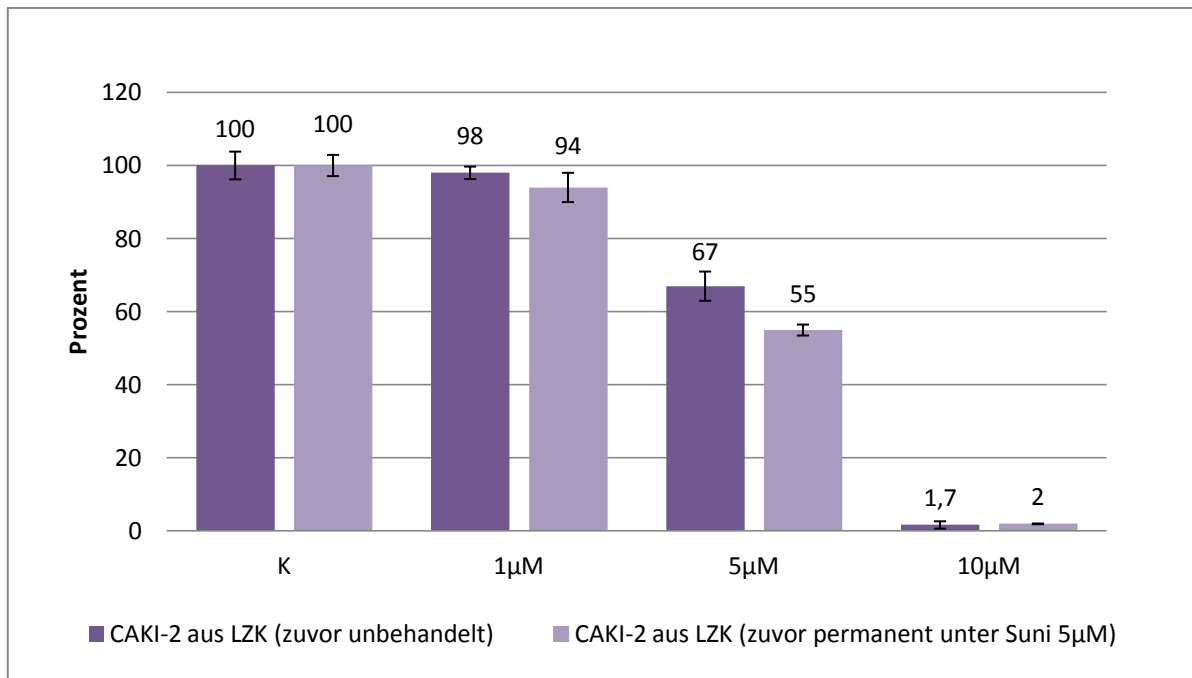


Abbildung 24: Ergebnisse des WST-1- Assays mit CAKI-2-Zellen aus der Langzeitkultur zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie, Passage 31 (K= unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur)

Bei diesem Viability Assay wurden die Zellen neben der Standarddosis von 5 µM auch noch mit 1 µM und 10 µM Sunitinib behandelt. Bei einer Sunitinib-Konzentration von 1 µM zeigen die zuvor unbehandelten CAKI-2- Zellen eine Viability von 98 Prozent verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (vgl. Abbildung 24). Bei den zuvor permanent mit 5 µM Sunitinib behandelten Zellen ist unter der niedrigeren Dosis von 1 µM eine Verminderung der Viability auf 94 Prozent gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Bei einer Konzentration von 5 µM des Tyrosinkinase-Inhibitors ist bei den zuvor unbehandelten CAKI-2- Zellen eine Verminderung der Viability auf 67 Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festzustellen. Die CAKI-2-Zellen, die schon zuvor permanent der 5µM- Dosis ausgesetzt waren, reagieren mit einer Reduktion der Viability auf 55 Prozent gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei einer hohen Konzentration von 10 µM ist sowohl bei den Zellen aus dem zuvor unbehandelten Kontrollzweig als auch bei denen aus dem Sunitinib-Dauerbehandlungszweig nahezu keine Zellvitalität mehr nachweisbar (1,7 Prozent bei den zuvor unbehandelten Zellen, 2 Prozent bei den Zellen unter permanenter Sunitinib-Behandlung, jeweils verglichen mit den nicht behandelten Kontrollzellen).

Die Zellzählung der Passage 32 erbrachte für die unbehandelten Kontrollzellen eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen pro cm^2 , die permanent unter Sunitinib-Einfluss stehenden CAKI-2- Zellen präsentierten sich mit einer Zellzahl von $1,3 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 (s. Tabelle 24). Diese Zahlen blieben bei der nächsten Zählung (Passage 33) im Wesentlichen konstant (unbehandelte Kontrolle $2,1 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 , permanent mit Sunitinib $5 \mu\text{M}$ behandelte Zellen $1,1 \times 10^5$ Zellen pro cm^2). Mit Zellen aus dieser Passage erfolgte die Durchführung eines erneuten Viability Assays (WST-1).

Tabelle 27 zeigt die Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte des WST-1-Assays mit CAKI-2-Zellen der Langzeitkultur aus Passage 33. Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse in Prozent.

Tabelle 27: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays mit Zellen der Langzeitkultur aus Passage 33 unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K = unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur; p= Passage)

	CAKI-2 aus LZK zuvor unbehandelt p33	CAKI-2 aus LZK zuvor permanent unter Suni $5 \mu\text{M}$ p33
K	2,22 ($\pm 0,09$)	2,22 ($\pm 0,09$)
$1 \mu\text{M}$	2,15 ($\pm 0,04$)	2,18 ($\pm 0,07$)
$5 \mu\text{M}$	1,43 ($\pm 0,03$)	1,35 ($\pm 0,04$)
$7,5 \mu\text{M}$	0,82 ($\pm 0,04$)	0,58 ($\pm 0,06$)
$10 \mu\text{M}$	0,04 ($\pm 0,01$)	0,01 ($\pm 0,01$)

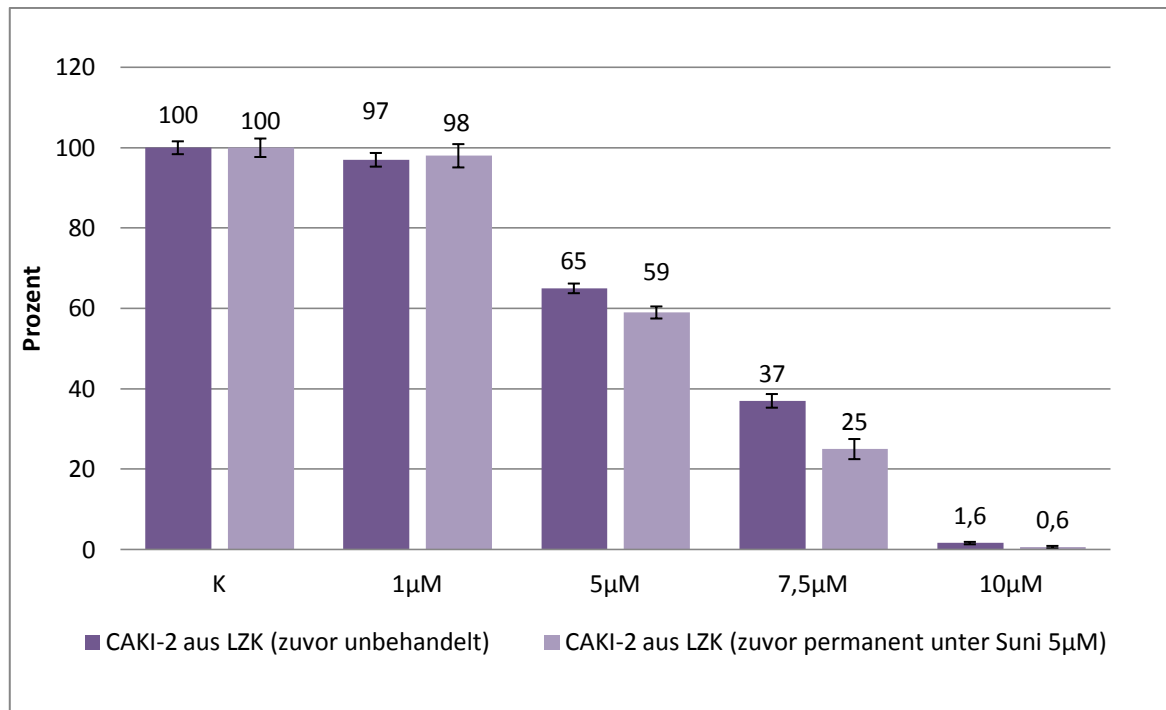


Abbildung 25: Ergebnisse des WST-1- Assays mit CAKI-2-Zellen aus der Langzeitkultur zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie, Passage 33 (K= unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur)

Dieser WST-1-Assay wurde mit vier Sunitinib-Konzentrationen durchgeführt: neben der Standarddosis von 5 µM wurden auch die Konzentrationen 1 µM, 7,5µM und 10 µM untersucht. Bei diesem Assay konnte bei einer Sunitinib-Dosis von 1 µM eine Verringerung der Zellvitalität auf 97 Prozent bei den zuvor unbehandelten sowie auf 98 Prozent bei den zuvor permanent behandelten CAKI-2-Zellen festgestellt werden (vgl. Abbildung 25). Bei einer Dosis von 5 µM zeigten die zuvor unbehandelten Kontrollzellen eine Reduktion der Viability auf 65 Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Zellen aus der Dauerbehandlung war eine Verminderung der Zellvitalität auf 59 Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen. Die Behandlung mit einer Sunitinib-Konzentration von 7,5 µM hat bei den zuvor unbehandelten Tumorzellen eine Reduktion der Viability auf 37 Prozent im Vergleich zur Kontrolle zur Folge. Bei den permanent mit Sunitinib 5 µM behandelten Zellen führt eine Dosis von 7,5 µM zu einer Abnahme der Viability auf 25 Prozent. Die hohe Sunitinib-Konzentration von 10 µM lässt den Anteil der vitalen Zellen bei beiden Zweigen der Langzeitkultur fast auf 0 sinken.

Bei der Zellzählung der Passage 34 war die Zellzahl der unbehandelten Kontrollzellen weiterhin konstant (2×10^5 Zellen pro cm^2 , vgl. Tabelle 24), während

die Zahl der Zellen mit ständiger Sunitinib-Behandlung wieder etwas sank ($0,9 \times 10^5$ Zellen pro cm^2). Die gleiche Zahl wurde bei der darauffolgenden Zählung (Passage 35) ermittelt. Die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle betrug ($2,2 \times 10^5$ Zellen pro cm^2).

5.3.3 Passage 36-41

Die Zellzählung der Passage 36 erbrachte folgende Werte: Zellzahl bei den unbehandelten Kontrollzellen 2×10^5 Zellen pro cm^2 , bei den Zellen unter Dauerbehandlung mit Sunitinib $1,3 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 (s. Tabelle 24). Mit Zellen dieser Passage wurde erstmals ein Proliferationsassay (Cell Proliferation ELISA BrdU) durchgeführt.

Tabelle 28 zeigt die gemessenen Absorptionswerte des Cell Proliferation ELISA (BrdU)-Assays mit CAKI-2-Zellen der Langzeitkultur aus Passage 36. Abbildung 26 veranschaulicht die Ergebnisse in Prozent.

Tabelle 28: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des Cell Proliferation ELISA (BrdU)-Assays mit Zellen der Langzeitkultur aus Passage 36 unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K = unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur; p= Passage)

	CAKI-2 aus LZK zuvor unbehandelt p36	CAKI-2 aus LZK zuvor permanent unter Suni 5μM p36
K	2,82 ($\pm 0,1$)	2,53 ($\pm 0,06$)
1μM	2,65 ($\pm 0,03$)	2,52 ($\pm 0,02$)
5μM	1,75 ($\pm 0,05$)	2,24 ($\pm 0,06$)
7,5μM	0,68 ($\pm 0,05$)	0,69 ($\pm 0,06$)
10μM	0,01 (± 0)	0,01 (± 0)

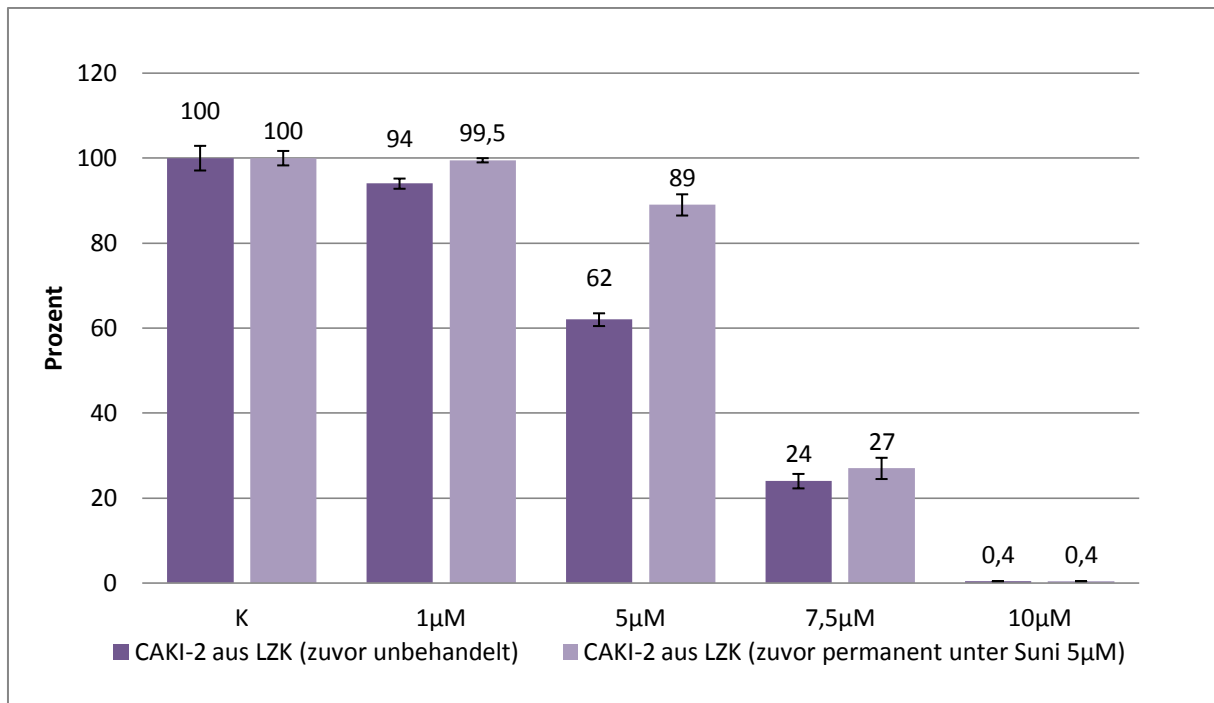


Abbildung 26: Ergebnisse des Cell Proliferation ELISA mit CAKI-2- Zellen aus der Langzeitkultur zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie, Passage 36 (K= unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur)

Der Anteil des BrdU in den zuvor nicht mit der Substanz behandelten CAKI-2- Zellen beträgt bei einer Sunitinib-Dosis von 1 µM 94 Prozent, bei den mit Sunitinib dauerbehandelten Zellen 99,5 Prozent (s. Abbildung 26). Bei den vor Durchführung des Assays unbehandelten CAKI-2- Zellen ist der Anteil des in die DNA eingebauten BrdU gegenüber der Kontrolle auf 62 Prozent verringert, bei den permanent mit Sunitinib behandelten Zellen ist eine Verringerung auf 89 Prozent festzustellen. Der BrdU-Anteil bei einer Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors von 7,5 µM beträgt im Vergleich zur Kontrolle bei den zuvor unbehandelten Zellen 24 Prozent, bei den permanent mit Sunitinib behandelten Zellen 27 Prozent. Bei einer Substanzkonzentration von 10 µM ist nahezu keine Zellproliferation mehr zu detektieren.

Bei der Zellzählung in Passage 37 konnte sowohl bei den unbehandelten ($2,6 \times 10^5$ Zellen pro cm^2) als auch bei den mit Sunitinib dauerbehandelten CAKI-2-Zellen ($1,6 \times 10^5$ Zellen pro cm^2) ein Anstieg der Zellzahl beobachtet werden (vgl. Tabelle 24). In Passage 38 blieben die Zellzahlen weitestgehend unverändert (Kontrollzellen $2,6 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 , Zellen unter Sunitinib-Dauerbehandlung $1,4 \times 10^5$ Zellen pro cm^2). In der darauffolgenden Passage 39 war ein Anstieg der Zellzahl der

dauerbehandelten Zellen zu bemerken ($1,9 \times 10^5$ Zellen pro cm^2), während die Zahl der unbehandelten Zellen unverändert blieb ($2,6 \times 10^5$ Zellen pro cm^2). Aus dieser Passage wurden wieder Zellen für einen erneuten Viability-Assay (WST-1) verwendet.

Tabelle 29 zeigt die gemessenen Absorptionswerte des WST-1-Assays mit CAKI-2-Zellen der Langzeitkultur aus Passage 39. Abbildung 27 veranschaulicht die Ergebnisse in Prozent.

Tabelle 29: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays mit Zellen der Langzeitkultur aus Passage 39 unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K = unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur; p= Passage)

WST-1	CAKI-2 aus LZK zuvor unbehandelt p39	CAKI-2 aus LZK zuvor permanent unter Sunitinib 5 μM p39
K	2,27 ($\pm 0,02$)	2,68 ($\pm 0,04$)
1μM	2,12 ($\pm 0,05$)	2,56 ($\pm 0,04$)
5μM	1,53 ($\pm 0,04$)	1,64 ($\pm 0,04$)
7,5μM	0,85 ($\pm 0,01$)	0,86 ($\pm 0,02$)
10μM	0,03 ($\pm 0,01$)	0,03 ($\pm 0,01$)

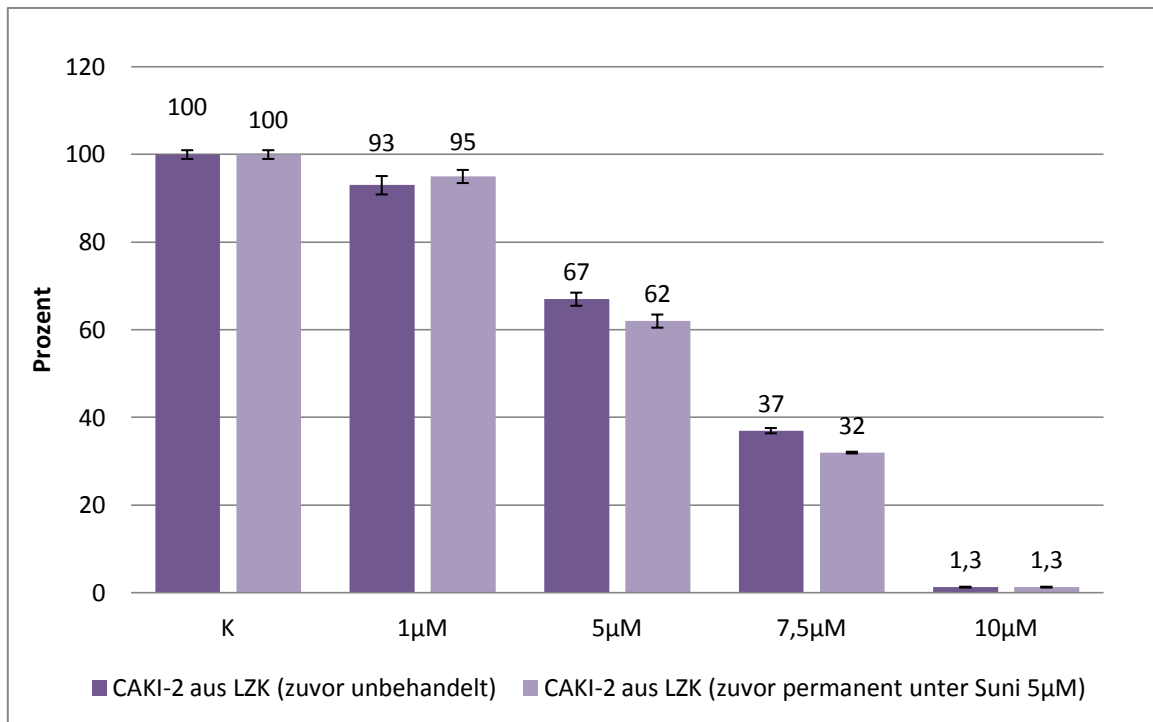


Abbildung 27: Ergebnisse des WST-1- Assays mit CAKI-2-Zellen aus der Langzeitkultur zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie, Passage 39 (K= unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur)

Bei diesem Assay beträgt die Viability bei den zuvor unbehandelten Zellen unter einer Sunitinib-Konzentration von 1 µM 93 Prozent im Vergleich zur Kontrolle, bei den mit Sunitinib dauerbehandelten Zellen sind es 95 Prozent (s. Abbildung 27). Eine Dosis von 5 µM des Tyrosinkinase-Inhibitors führt zu einer Verminderung der Zellvitalität auf 67 Prozent bei den nicht vorbehandelten CAKI-2-Zellen, bei den permanent behandelten kommt es zu einer Reduktion auf 62 Prozent gegenüber der Kontrolle. Bei einer Sunitinib-Konzentration von 7,5 µM beträgt die Viability der zuvor unbehandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle 37 Prozent, die der mit Sunitinib 5 µM vorbehandelten Zellen 32 Prozent. Bei der hohen Dosis der Substanz von 10 µM sind in beiden Zweigen der Langzeitkultur nahezu keine vitalen Zellen mehr zu detektieren (jeweils 1,3 Prozent verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen).

In Passage 40 brachte die Zellzählung folgende Ergebnisse: bei den unbehandelten Kontrollzellen wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 gezählt, bei den permanent mit Sunitinib 5 µM behandelten Zellen $1,4 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 (vgl. Tabelle 24).

In Passage 41 der Langzeitkultur zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten CAKI-2-Zelllinie wurden bei der Zellzählung folgende Zahlen erhoben: die Zahl der unbehandelten Kontrollzellen betrug $2,6 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 , die der ständig mit Sunitinib $5 \mu\text{M}$ behandelten $1,6 \times 10^5$ pro cm^2 (vgl. Tabelle 24). Aus dieser Passage erfolgte erneut die Durchführung eines Viability Assays (WST-1) sowie eines Proliferationsassays (Cell Proliferation ELISA BrdU).

Tabelle 30 zeigt die gemessenen Absorptionswerte des WST-1-Assays mit CAKI-2-Zellen der Langzeitkultur aus Passage 41.

Tabelle 30: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des WST-1-Assays mit Zellen der Langzeitkultur aus Passage 41 unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K = unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur; p= Passage)

WST-1	CAKI-2 aus LZK zuvor unbehandelt p41	CAKI-2 aus LZK zuvor permanent unter Suni 5 μM p41
K	2,84 ($\pm 0,04$)	2,73 ($\pm 0,05$)
Suni 1μM	2,63 ($\pm 0,04$)	2,45 ($\pm 0,04$)
Suni 5μM	1,96 ($\pm 0,06$)	2,42 ($\pm 0,04$)
Suni 7,5μM	1,12 ($\pm 0,02$)	1,34 ($\pm 0,05$)
Suni 10μM	0,05 ($\pm 0,01$)	0,07 ($\pm 0,04$)

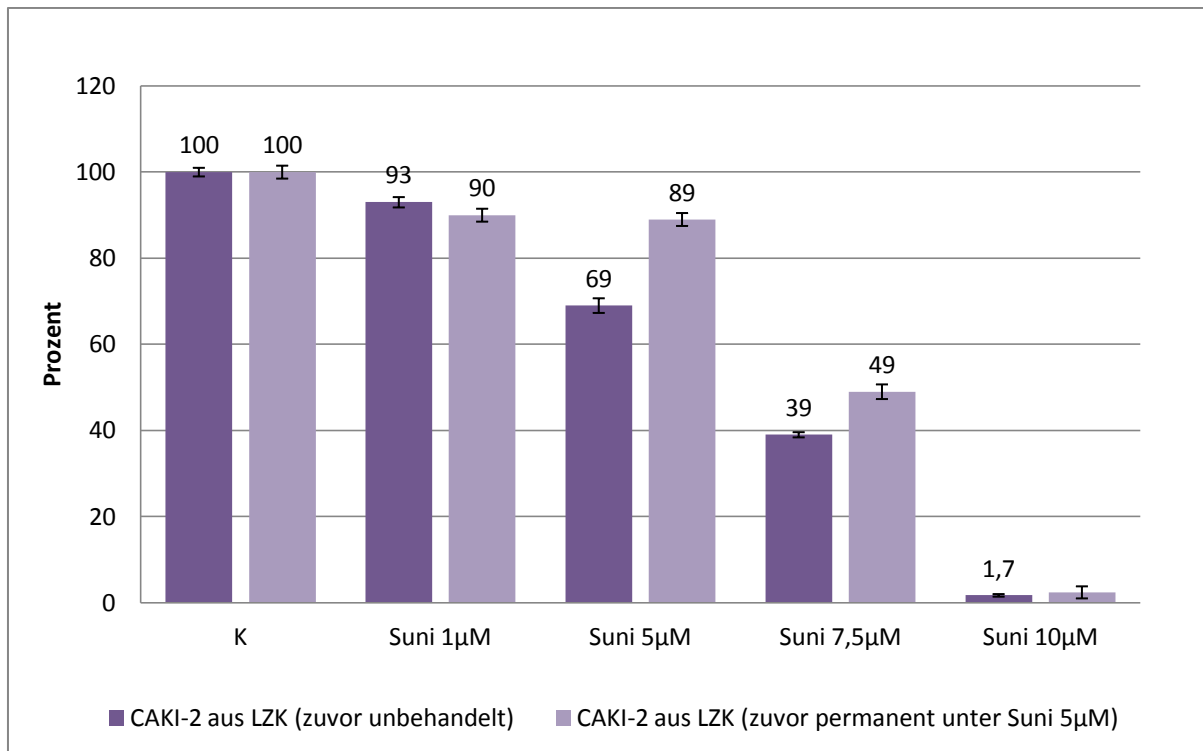


Abbildung 28: Ergebnisse des WST-1- Assays mit CAKI-2-Zellen aus der Langzeitkultur zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie, Passage 41 (K= unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur)

Die Viability der zuvor unbehandelten Kontrollzellen beträgt bei einer Sunitinib-Konzentration von 1 µM in diesem Assay 93 Prozent, bei den zuvor permanent mit Sunitinib 5 µM behandelten CAKI-2-Zellen 90 Prozent (s. Abbildung 28). Werden die Zellen einer Konzentration von 5 µM des Tyrosinkinase-Inhibitors ausgesetzt, kommt es zu einer Verminderung der Zellvitalität der zuvor Sunitinib-freien Kontrollzellen auf 69 Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei den zuvor dauerhaft mit Sunitinib 5 µM behandelten Zellen ist diese Reduktion mit einer Viability von 89 Prozent gegenüber der Kontrolle. Eine Sunitinib-Dosis von 7,5 µM führt bei den zuvor unbehandelten Zellen zu einer Verminderung der Viability auf 39 Prozent verglichen mit der Kontrolle, bei den zuvor permanent mit Sunitinib behandelten CAKI-2-Zellen zu einer Verminderung auf 49 Prozent.

Bei einer hohen Substanzkonzentration von 10 µM sind sowohl bei den zuvor unbehandelten als auch bei den zuvor Sunitinib-dauerbehandelten CAKI-2-Zellen nur noch sehr wenige vitale Zellen nachzuweisen (1,7 Prozent bei den zuvor unbehandelten Zellen bzw. 2,4 Prozent bei den vorbehandelten)

Tabelle 31 zeigt die gemessenen Absorptionswerte des Cell Proliferation ELISA (BrdU)-Assays mit CAKI-2-Zellen der Langzeitkultur aus Passage 41. Abbildung 29 veranschaulicht die Ergebnisse in Prozent.

Tabelle 31: Mittelwerte der gemessenen Absorptionswerte (Wellenlänge 450 nm) des Cell Proliferation ELISA (BrdU)-Assays mit Zellen der Langzeitkultur aus Passage 41 unter Behandlung mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen; Standardabweichung in Klammern darunter (K = unbehandelte Kontrolle; LZK= Langzeitkultur; p= Passage)

	CAKI-2 aus LZK zuvor unbehandelt p41	CAKI-2 aus LZK zuvor permanent unter Suni 5µM p41
K	2,12 (± 0,07)	1,95 (± 0,11)
1µM	1,95 (± 0,05)	1,87 (± 0,07)
5µM	1,44 (± 0,03)	1,71 (± 0,08)
7,5µM	0,52 (± 0,04)	1,23 (± 0,05)
10µM	0,08 (± 0,02)	0,01 (± 0,01)

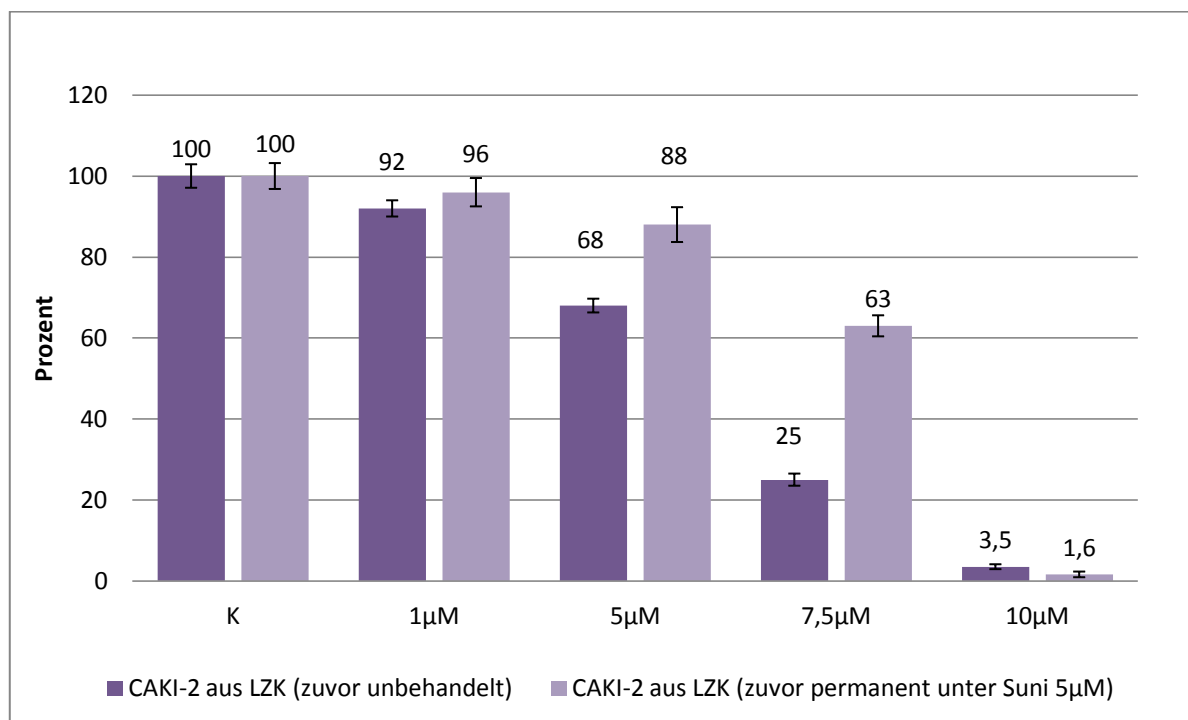


Abbildung 29: Ergebnisse des Cell Proliferation ELISA mit CAKI-2- Zellen aus der Langzeitkultur zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie, Passage 41 (LZK= Langzeitkultur)

Der in Passage 41 durchgeführte Proliferationsassay zeigte bei einer Sunitinib-Konzentration von 1 μ M im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen Anteil von BrdU von 92 Prozent bei den zuvor unbehandelten CAKI-2-Zellen sowie einen Anteil von 96 Prozent bei den mit Sunitinib dauerbehandelten Tumorzellen (s. Abbildung 29). Bei einer Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors von 5 μ M ist bei den vorher Sunitinib-freien Zellen ein BrdU-Anteil von 68 Prozent gegenüber der Kontrolle festzustellen, bei den permanent behandelten Zellen ein Anteil von 88 Prozent. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde, unter einer Substanzdosis von 7,5 μ M, 25 Prozent BrdU in die DNA der zuvor nicht mit Sunitinib behandelten Tumorzellen eingebaut, bei den vorbehandelten Zellen waren es 63 Prozent. Die Sunitinib-Konzentration von 10 μ M führte nur noch zu einem BrdU-Einbau von 3,5 Prozent bei den zuvor unbehandelten Zellen sowie von 1,6 Prozent bei den permanent behandelten.

Nach insgesamt 16 Passagen wurde die Langzeitkultur beendet. Abbildung 30 gibt nochmals einen Überblick über die Entwicklung der Viability der CAKI-2-Zellen der Langzeitkultur, die nur für die Dauer eines Assays mit Sunitinib 5 μ M behandelt wurden sowie die permanent mit 5 μ M des Tyrosinkinase-Inhibitors behandelten Tumorzellen. Abbildung 31 veranschaulicht dies für eine Sunitinib-Konzentration von 7,5 μ M.

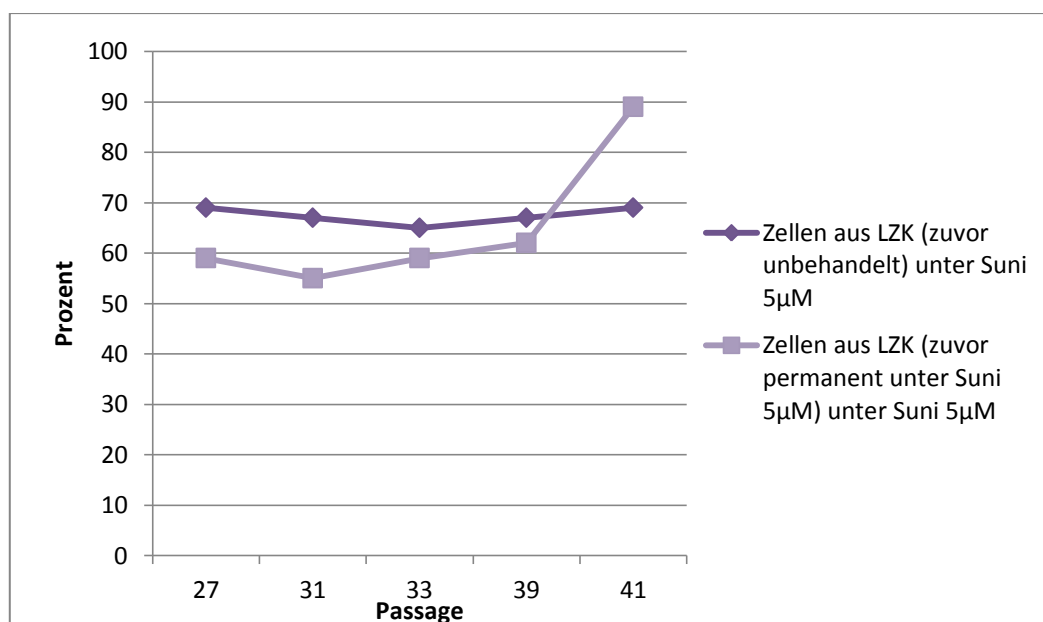


Abbildung 30: Übersicht über die Entwicklung der Viability der CAKI-2-Zellen in der Langzeitkultur unter Behandlung mit 5 μ M Sunitinib (LZK= Langzeitkultur)

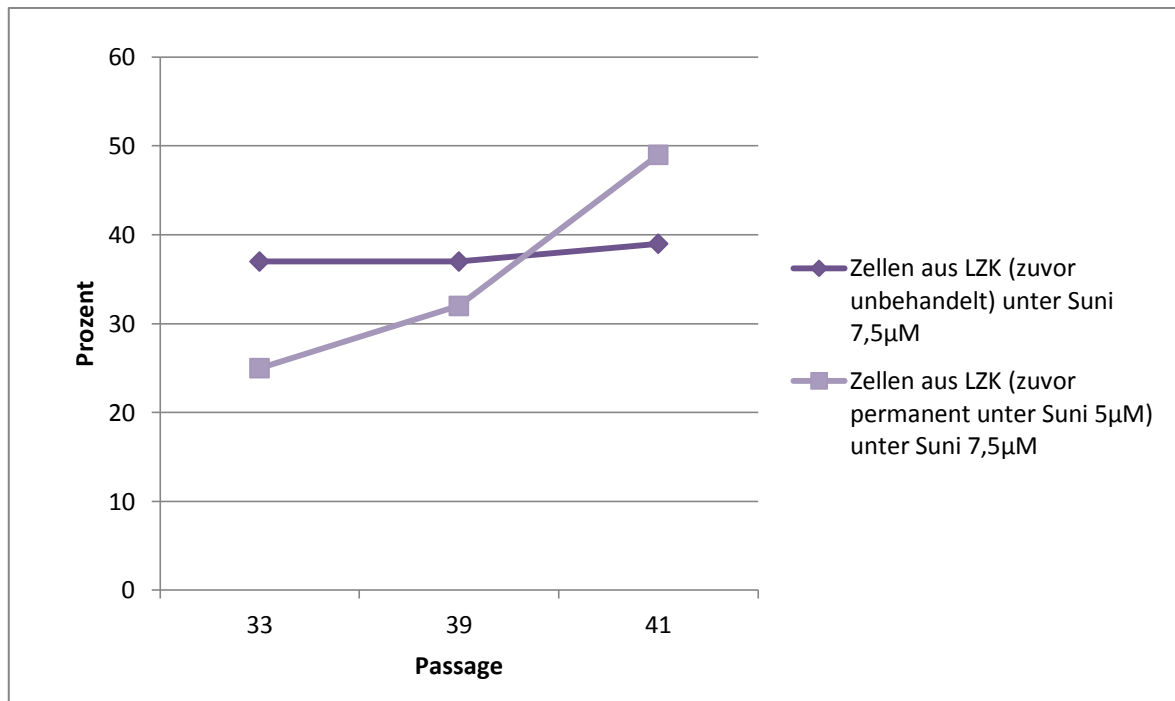


Abbildung 31: Übersicht über die Entwicklung der Viability der CAKI-2-Zellen in der Langzeitkultur unter Behandlung mit 7,5 µM Sunitinib (LZK= Langzeitkultur)

6. Diskussion

Da sich bei Diagnosestellung eines Nierenzellkarzinoms schon 15-20 % der Patienten in einem metastasierten Tumorstadium befinden und weitere 20-30 % metachrone Metastasen entwickeln, ist oft eine systemische Therapie notwendig. Da das Nierenzellkarzinom kaum sensibel auf Radio- oder konventionelle Chemotherapie reagiert, hat sich in den letzten Jahren die systemische Therapie mit Multityrosinkinase-Inhibitoren wie Sunitinib (Sutent®) etabliert. Sunitinib wirkt vor allem antiangiogenetisch, hat aber auch direkte zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen. Die initiale Ansprechrate auf diese Therapie beträgt etwa 65 bis 70 Prozent. Leider entwickelt ein Großteil der behandelten Patienten eine Resistenz gegen diese Form der Therapie, sodass es zu einem Progress des Tumorleidens kommt. 30 bis 35 Prozent der Patienten sprechen gar nicht auf eine Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren an [Porta et al. 2012]. Daher ist es essentiell, die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Resistenzentwicklung zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit war es, eine gegen den Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib resistente Nierenzellkarzinom-Zelllinie zu etablieren und Veränderungen zellbiologischer Parameter unter der Therapie zu analysieren.

6.1 Analyse des antiproliferativen Effektes von Sunitinib auf vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien und Definition des IC_{50} -Wertes

Bevor eine Langzeitkultur unter Dauerbehandlung mit Sunitinib begonnen werden konnte, mussten zunächst eine geeignete Nierenzellkarzinom-Zelllinie sowie eine adäquate Sunitinib-Dosis zur Dauerbehandlung dieser Zellen gefunden werden. Dafür wurden vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien (786-O, A-498, CAKI-1 und CAKI-2) jeweils mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen zwischen 0,1 und 20 μ M der Substanz behandelt. Die Zellen wurden in zwei verschiedenen Ausgangszellzahlen pro Well ausgesät. Die Auswertung erfolgte mittels Viability Assay (WST-1).

Alle vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien weisen ähnliche IC_{50} -Werte zwischen 4 und 6 μ M Sunitinib auf. Es war weiterhin festzustellen, dass die Sunitinib-Konzentrationen von 0,1 und 1 μ M nahezu keinen Effekt auf die vier Zelllinien hatten, während die Konzentrationen von 10 oder 20 μ M für alle Zelllinien so toxisch waren, dass quasi

keine vitalen Zellen mehr verblieben. Insgesamt reagierte die Zelllinie A-498 am sensibelsten auf die Behandlung mit Sunitinib, die Zelllinie CAKI-2 tolerierte diese am besten.

Auch in anderen Arbeiten werden ähnliche IC_{50} -Werte für die verschiedenen Nierenzellkarzinom-Zelllinien angegeben, es wurden zum Beispiel für die Zelllinien 786-O und A-498 IC_{50} -Werte zwischen 4 und 10 μM Sunitinib aufgeführt [Huang et al. 2010], wobei in dieser Versuchsanordnung die Ausgangszellzahl 3×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte betrug. Für die Zelllinien CAKI-1 und CAKI-2 definierten Miyake et al. IC_{50} -Werte von 2,8 bzw. 2,48 μM Sunitinib. Hier wurden die Zellen zur Durchführung der Viability Assays in einer Zellzahl von 2×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät [Miyake et al. 2012]. In einer Publikation von Singhal et al. wurden für die Zelllinien A-498 (15,3 μM) und CAKI-2 (10,2 μM) wesentlich höhere Werte angegeben. Lediglich für die Zelllinie 786-O wird mit 7 $\mu mol/l$ Sunitinib ein nur leicht höherer Wert postuliert. Allerdings wurde in diesem Versuchsaufbau mit einer Ausgangszellzahl von 20×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte gearbeitet [Singhal et al. 2010]. Diese hohe Zelldichte hat zur Folge, dass die Zellen insgesamt weniger sensibel auf die Behandlung mit einer Substanz, in diesem Falle Sunitinib, ansprechen. Dieser Effekt konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Alle vier getesteten Nierenzellkarzinom-Zelllinien tolerierten die Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor in höherer Zelldichte besser als in weniger dicht wachsenden.

6.2 Analyse des direkten zytotoxischen Effektes von Sunitinib auf Tumorzellen

Nachdem für die Zelllinien 786-O, A-498, CAKI-1 und CAKI-2 ein individueller IC_{50} -Wert definiert war, wurden drei Zelllinien ausgewählt, um weitere Assays durchzuführen. Die Wahl fiel A-498, da diese Zelllinie in den Vorversuchen am sensibelsten reagiert hatte, auf CAKI-2, die die Sunitinib-Behandlung am besten toleriert hatte, sowie 786-O. Die Durchführung der zusätzlichen Assays hatte zwei Gründe: zum Einen sollte mehr über den genauen Wirkmechanismus des Tyrosinkinase-Inhibitors Sunitinib auf die Tumorzellen herausgefunden werden. Zum Anderen dienten dieser Versuche auch der Suche nach einem weiteren geeigneten

Assay zum Monitoring einer eventuellen Resistenzentwicklung, neben den Viability Assays XTT und WST-1.

6.2.1 Cytotoxicity Detection LDH plus Assay

Die Auswertung des Cytotoxicity Detection LDH plus Assay zeigt, dass bei allen drei getesteten Zelllinien unter Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Tyrosinkinase-Inhibitors die messbare LDH-Konzentration höher liegt als bei den unbehandelten Zellen. Allerdings führt eine höhere Sunitinib-Konzentration nicht zu einer weiteren Zunahme der LDH-Freisetzung. Bei der Zelllinie CAKI-2 kommt es bei Steigerung der Sunitinib-Dosis sogar zu einer Abnahme der messbaren LDH. Man würde ja vermuten, dass sich eine nekrosefördernde Wirkung einer Substanz bei Dosis-Erhöhung sogar noch verstärkt. Es kann also konstatiert werden, dass eine Behandlung mit Sunitinib eine erhöhte LDH-Freisetzung bei den getesteten Nierenzellkarzinom-Zelllinien zur Folge hat. In diesem Zusammenhang sollte beachtet werden, dass die gemessenen Absorptionswerte so niedrig waren, dass es bereits bei einem Unterschied von 0,01 im Absorptionswert zu einem prozentualen Unterschied von bis zu 2 Prozent kam. Somit erschien der Cytotoxicity Detection LDH plus Assay zum Monitoring einer möglichen Resistenzentwicklung nicht geeignet.

In der Literatur wird häufig beschrieben, dass die Tumorzellnekrose beim Nierenzellkarzinom in vivo eine Folge der antiangiogenetischen Effekte des Sunitinib ist. Die Nekrose resultiert also nicht durch eine direkte Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors auf die Tumorzellen, sondern durch die Minderversorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen [Faivre et al. 2007; Ellis, Hicklin 2008; Huang et al. 2010]. Bei anderen Tumorentitäten, etwa dem gastrointestinalen Stromatumor (GIST), konnte bereits eine direkte signifikante nekrotische Wirkung des Sunitinib auf die Tumorzellen nachgewiesen werden, während die Dichte der Blutgefäße nach der Behandlung kaum beeinträchtigt war [Seandel et al. 2006]. Auch bei der sehr seltenen Tumorart des alveolären Weichteilsarkoms wurden neben den antiangiogenetischen Wirkungen direkte nekrosefördernde Effekte auf die Tumorzellen beobachtet [Stacchioti et al. 2011]. Blasentumoren repräsentieren eine

weitere Entität, bei der gezeigt werden konnte, dass Sunitinib eine Zellnekrose induziert [Santoni et al. 2013].

6.2.2 Cell Death Detection ELISA plus Assay

Bei der Auswertung der Ergebnisse des Cell Death Detection ELISA plus zeigte sich, dass lediglich die Zelllinie 786-O bei einer Steigerung der Sunitinib-Dosis auch mit einem erhöhten messbaren Gehalt an Histonkörpern reagiert. Dies steht im Widerspruch zu einer Publikation von Makhov und Kollegen, die bei der Zelllinie 786-O keine apoptose-induzierende Wirkung des Sunitinib nachweisen konnten [Makhov et al. 2012]. Bei den beiden anderen Zelllinien (A-498 und CAKI-2) ist jeweils bei einer Sunitinib-Konzentration von 1 μM eine erhöhte Menge an Histonkörpern verglichen mit der unbehandelten Kontrolle festzustellen. Bei einer Dosis-Steigerung auf 5 μM kommt es jedoch zu keiner weiteren Steigerung der Histonkörper-Freisetzung. Es kann also eine leicht erhöhter messbarer Gehalt an Histonkörpern bei den mit Sunitinib behandelten Zellen detektiert werden. Auch hier wurden aber verglichen mit der Positivkontrolle wieder so niedrige Absorptionswerte gemessen, dass sich eine Änderung von 0,01 des absoluten Wertes (was im Rahmen der Mess- Ungenauigkeit häufig auftritt) in einer prozentualen Änderung von etwas über 2 Prozent widerspiegelt.

In der Literatur findet man weitere Beispiele, die besagen, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor eine apoptose-induzierende Wirkung in vitro hat. Canter et al. behandelten in ihrer Arbeit acht Nierenzellkarzinom-Zelllinien (darunter auch 786-O) mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen zwischen 0,1 und 1000 μM . Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden sowohl ein Proliferations- als auch ein Apoptose-Assay durchgeführt. Neben einem proliferationshemmenden Effekt, der auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte, hatte der Tyrosinkinase-Inhibitor auf alle getesteten Nierenzellkarzinom-Zelllinien auch eine apoptose-induzierende Wirkung. Allerdings wurde diese Wirkung erst bei sehr viel höheren Sunitinib-Konzentrationen erreicht (bei der Zelllinie 786-O sind bei einer Sunitinib-Konzentration von 40 μM ca. 40 Prozent der Zellen apoptotisch) [Canter et al. 2011]. In der vorliegenden Arbeit konnten aber bereits bei einer Sunitinib-Konzentration von 20 μM nahezu keinen vitalen Zellen mehr nachgewiesen werden, sowohl bei einer

Ausgangszellzahl von 1×10^3 als auch von $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well. Leider wurden in der Arbeit von Canter et al. keine Zellzahlen angegeben. Vermutlich liegen diese aber deutlich höher. Bender und Ullrich beschrieben in ihrer Publikation ebenfalls einen dosisabhängigen apoptoseinduzierenden Effekt von Sunitinib auf all ihre untersuchten Nierenzellkarzinom-Zelllinien (u.a. A-498, CAKI-1 und CAKI-2). Die Werte, bei denen erstmals eine Apoptose beobachtet werden konnte, lagen zwischen 12,5 und 16,5 μM . Konkrete Zellzahlen wurden auch hier nicht genannt [Bender, Ullrich 2012]. Für zukünftige Apoptose-Assays sollten die Tumorzellen also in wesentlich höherer Zelldichte ausgesät werden. Dann wären vermutlich auch höhere tolerable Sunitinib-Dosen zu erreichen. Eine andere Möglichkeit wäre die Durchführung eines alternativen Assays zur Detektion von Apoptose.

Es sind weitere Tumorentitäten bekannt, bei denen der Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib eine Induktion der Apoptose in Tumorzellen bewirkt, etwa das Glioblastom [de Bouard et al. 2007], das Medulloblastom [Yang et al. 2010], das hepatozelluläre Karzinom [Huynh et al. 2009], das Urothelkarzinom [Sonpavde et al. 2009] oder das kolorektale Karzinom [Sun et al. 2012]. Aber auch auf nicht-tumoröse Zellen hat Sunitinib einen apoptosefördernden Effekt, zum Beispiel auf Myozyten [Hasinoff et al. 2008].

6.2.3 Cell Proliferation ELISA (BrdU)

Bei der Auswertung des Cell Proliferation ELISA (BrdU) fiel auf, dass bei allen drei getesteten Nierenzellkarzinom-Zelllinien bei einer Sunitinib-Konzentration von 5 μM eine deutliche Hemmung der Proliferation auftrat. Das Ausmaß war aber zwischen den einzelnen Zelllinien verschieden. Bei den Zelllinien 786-O und A-498 war die Proliferationshemmung deutlicher ausgeprägt als bei CAKI-2. Die Ergebnisse dieses Assays ließen den Schluss zu, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib an den Tumorzellen am ehesten über eine Proliferationshemmung wirkt. Somit wurde der Cell Proliferation ELISA (BrdU) als geeigneter zusätzlicher Assays zum Monitoring einer eventuellen Resistenzentwicklung erachtet.

Xin et al. beschrieben ebenfalls eine proliferationshemmende Wirkung des Sunitinib auf die Nierenzellkarzinom-Zelllinien 786-O, RCC-4 und Renca. Hier wurden die Zellen ebenfalls mit Sunitinib-Konzentrationen zwischen 1 μM und 10 μM behandelt.

Nach 48-stündiger Inkubationszeit mit Sunitinib 5 μM war etwa bei der Zelllinie 786-O eine um 60 Prozent verringerte Proliferationsrate im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen festzustellen, was gut zu den oben erläuterten Ergebnissen passt. Allerdings wurde neben der proliferationshemmenden Wirkung auch eine apoptosefördernde Wirkung des Sunitinib beschrieben [Xin et al. 2009]. Die letztgenannte Wirkung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden (s.oben).

Auch bei anderen Tumoren konnte ein direkter proliferationshemmender Effekt des Tyrosinkinase-Inhibitors nachgewiesen werden [Christensen 2007]. Dazu gehören etwa das kleinzellige Bronchialkarzinom [Abrams et al. 2003], Ösophagus- und Magenkarzinom [Lyros et al. 2010], der gastrointestinale Stromatumor (GIST) [Prenen et al. 2006] und verschiedenen Leukämie-Formen [Ikezoe et al. 2006, Nishioka 2008].

6.3 Etablierung einer gegenüber Sunitinib resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie

Nach den Auswertungen der oben genannten Assays wurde die Zelllinie CAKI-2 zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie ausgewählt. Die CAKI-2- Zellen wurden in zwei Arme aufgeteilt: eine unbehandelte Kontrolllinie sowie eine Linie, die permanent mit Sunitinib in einer Dosis von 5 μM behandelt wurde. Da im Vorfeld davon ausgegangen wurde, dass die Tumorzellen auf eine permanente Behandlung mit Sunitinib in einer bestimmten Dosis sensibler reagieren würden als nur bei einer temporären Behandlung (wie dies bei der Ermittlung der IC_{50} -Werte der Fall gewesen war) wurde eine Sunitinib-Konzentration etwas unterhalb des IC_{50} -Wertes von 6 μM ausgewählt. Die Dosis wurde im Verlauf nicht gesteigert. Die Behandlung erfolgte über 16 Passagen. Dies entspricht einem Zeitraum von 16 Wochen.

In der Literatur gibt es aktuell keine Untersuchung, deren Fokus auf der Resistenzentwicklung an sich und der Beobachtung zellbiologischer Parameter während der Resistenzentwicklung liegt. Bei allen Arbeiten zu den Mechanismen einer Resistenz wird lediglich wenig ausführlich dargelegt, wie resistente Zellen

kultiviert wurden. Hierbei gibt es kein einheitliches Vorgehen, was die Etablierung einer auf eine bestimmte Substanz resistente Zelllinie angeht.

Gotink et al. begannen in ihrer Arbeit zur Etablierung einer Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie (786-O) sowie einer Kolonkarzinom-Zelllinie (HT-29) die Behandlung der Zellen mit einer Dosis, die dem vorher mittels Viability Assay ermittelten IC_{50} -Wert entsprach. Diese wurde dann im Verlauf sukzessive gesteigert. Während der Behandlungsdauer von über 12 Monaten wurde die Resistenzentwicklung der Zellen ebenfalls mittels Viability Assay und Proliferationsassay überwacht. Zusätzlich wurden per Lichtmikroskop morphologische Veränderungen der permanent mit Sunitinib behandelten Tumorzellen beobachtet [Gotink et al. 2011].

Sakai et al. behandelten in ihrer Arbeit zur Resistenzentwicklung die Nierenzellkarzinom-Zelllinie ACHN ebenfalls mit steigenden Dosen bis zu einer Sunitinib-Konzentration von 10 μM . Mit dieser Dosis wurden die Zellen dann über einen Zeitraum von 20 Passagen behandelt. Danach wurden die ACHN-Zellen als resistent angesehen, zwischendurch erfolgte kein Monitoring einer möglichen Resistenzentwicklung [Sakai et al. 2013].

Prior et al. generierten eine Sunitinib-resistente CAKI-2- Zelllinie, in dem sie die Zellen über vier Monate ebenfalls mit steigenden Dosen des Tyrosinkinase-Inhibitors behandelten, beginnend mit dem vorher ermittelten IC_{50} -Wert, der in diesem Fall 8 μM betrug. Die Dosis wurde bis auf 14 μM erhöht. Auch hier erfolgte während der Permanent-Behandlung kein Monitoring einer Resistenzentwicklung [Prior et al. 2014].

Betrachtet man die Arbeiten der verschiedenen Autoren, fällt die deutliche Diskrepanz der vorher ermittelten IC_{50} -Werte auf. Selbst bei gleichen Zelllinien ergeben sich zum Teil große Unterschiede. Gotink et al. definierten beispielsweise für die Zelllinie 786-O einen IC_{50} -Wert von 1,2 μM . In der vorliegenden Arbeit konnte nach mehrmaliger Wiederholung des Versuchsansatzes für dieselbe Zelllinie ein IC_{50} -Wert von 6 μM festgelegt werden. Dieser Wert liegt fünfmal höher als in der o.g. Publikation. Dafür könnte es verschiedene Gründe geben: zum Einen eine unterschiedliche Zellzahl. Wie bereits weiter oben beschrieben, reagieren dichter wachsende Zellverbände weniger sensibel auf eine Substanz. Daher sollte zur

besseren Reproduzierbarkeit auch immer die Ausgangszellzahl angegeben werden. Zum anderen scheint auch die Dauer der Exposition gegenüber einer Substanz eine Rolle zu spielen. In der vorliegenden Arbeit waren die Zellen der Substanz für fünf Tage ausgesetzt, bevor ein Viability Assay durchgeführt wurde. Bei Gotink et al. betrug die Behandlungsdauer 96 Stunden, also 4 Tage. Bei Prior et al. werden 72 Stunden (3 Tage) als Dauer der Exposition gegenüber Sunitinib angegeben. Ein weiterer Faktor, der beachtet werden sollte, ist der verwendete Assay. In den beiden erläuterten Arbeiten wird jeweils mit dem MTT Assay gearbeitet. Dieser beruht, genau wie der in dieser Arbeit benutzte Assay WST-1, auf der Spaltung von in der Reaktionslösung enthaltenen Tetrazoliumsalze durch zelluläre Enzyme (NAD-abhängige Dehydrogenasen) zu Formazan.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass die IC_{50} -Werte einer Zelllinie gegenüber einer bestimmten Substanz wesentlich besser untereinander verglichen werden könnten, wenn die Ermittlung einheitlicher ablaufen würde.

6.4 Charakterisierung von zellbiologischen Parametern unter der Therapie

Beide Arme der Langzeitkultur, sowohl die unbehandelten Kontrollzellen als auch die permanent mit Sunitinib behandelten CAKI-2-Zellen, wurden einmal wöchentlich passagiert. Hierbei erfolgte auch eine Zellzählung. Ziel dieser Maßnahme war es, herauszufinden, ob sich eine mögliche Resistenzentwicklung möglicherweise in einem Anstieg der Zellzahl der permanent behandelten Zellen widerspiegeln würde. Zu definierten Zeitpunkten wurden außerdem Viability Assays und Proliferationsassays durchgeführt.

Zu Beginn der Langzeitkultivierung zeigten sich sehr große Unterschiede in der Zellzahl der beiden Arme. Die Dauerbehandlung der CAKI-2-Zellen führte zunächst zu einem Einbruch der Zellzahl. In dieser Phase wurde erstmals ein Viability Assay durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass diejenigen CAKI-2-Zellen, die permanent mit Sunitinib 5 μ M behandelt wurden, empfindlicher reagierten als die Tumorzellen, die nur für die Dauer des Assays mit der gleichen Dosis des Tyrosinkinase-Inhibitors behandelt worden waren. Bei diesen war in etwa dieselbe Reduktion der Viability zu erkennen, die auch schon in den Versuchen zur Festlegung eines IC_{50} -Wertes

gemessen worden war. Es konnte also festgestellt werden, dass die gleiche Dosis der Substanz stärker auf die Zellen wirkt, wenn sie kontinuierlich und nicht nur für die Dauer eines Assays appliziert wird. Um sicherzustellen, dass auch unter Dauerbehandlung genug vitale Zellen verblieben, die eine Resistenz entwickeln konnten, wurde für die permanente Behandlung eine Dosis gewählt, die etwas unterhalb des vorher für die Zelllinie ermittelten IC_{50} -Wertes lag.

Im Laufe der Behandlung konnten bei den permanent behandelten Zellen trotz der Sunitinib-Dauerapplikation sukzessive ansteigende Zellzahlen verzeichnet werden. In den in Passage 31 und 33 durchgeführten Viability Assays reagierten die dauerbehandelten CAKI-2-Zellen aber immer noch sensibler auf die gleiche Dosis Sunitinib wie die nur für die Dauer der Assays behandelten Zellen. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich noch keine Resistenz gegenüber dem Tyrosinkinase-Inhibitor manifestiert.

Drei Passagen später, bei der Betrachtung der Ergebnisse des ersten Proliferationsassays mit Zellen der Passage 36, fiel auf, dass die dauerbehandelten CAKI-2-Zellen eine deutlich geringere Proliferationshemmung zeigten als die zuvor unbehandelten Zellen. Selbst bei einer Sunitinib-Konzentration von 7,5 μM war dieser Effekt zu beobachten.

Die Umgehung der Proliferationshemmung trotz permanenter Sunitinib-Behandlung (zu diesem Zeitpunkt über 11 Wochen) ließ also den Schluss zu, dass sich eine Resistenz gegenüber der Substanz entwickelte.

Trotz geringerer Proliferationshemmung wiesen die permanent mit Sunitinib 5 μM behandelten CAKI-2-Zellen auch drei Passagen später noch immer eine geringere Viability auf als die nur für die Dauer des Assays mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor behandelten Zellen. Die Unterschiede waren jedoch nicht mehr so ausgeprägt wie zu Beginn der Langzeitkultivierung. Dies könnte daran liegen, dass zu diesem Zeitpunkt bei den permanent mit Sunitinib behandelten Tumorzellen sowohl bereits resistente Zellen vorhanden waren (die trotz Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor proliferieren konnten) als auch Zellen, die nach wie vor sensibel auf die Substanz reagierten. Auf diese hatte die Substanz nach wie vor einen zytotoxischen Effekt, der zu einer Verminderung der Viability führte.

Erst in Passage 41, also 16 Passagen nach Initiierung der Langzeitkultur, fiel bei der Auswertung des Viability Assays auf, dass die mit Sunitinib 5 μ M dauerbehandelten CAKI-2-Zellen im Vergleich zu den zuvor unbehandelten Zellen eine deutlich höhere Viability aufwiesen, sowohl bei einer Konzentration von 5 μ M als auch von 7,5 μ M des Tyrosinkinase-Inhibitors. Der gleichzeitig durchgeführte Proliferationsassay brachte ähnliche Ergebnisse. Auch hier war bei den permanent mit der Substanz behandelten Tumorzellen die Proliferationshemmung deutlich geringer als bei den zuvor unbehandelten Zellen, was ja bereits in Passage 36 beobachtet werden konnte. Bei einer Konzentration von 7,5 μ M war bei den permanent mit Sunitinib behandelten CAKI-2-Zellen ebenfalls eine geringere Hemmung der Proliferation zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt kann davon ausgegangen werden, dass sich die Sunitinib-resistenten gegen die nach wie vor sensiblen Tumorzellen durchgesetzt haben, es folglich zu einer Selektion des resistenten Zelltyps gekommen ist.

In Zusammenschau der Ergebnisse sowohl der Viability- als auch der Proliferationsassays kann also konstatiert werden, dass es nach 16 Wochen der Dauerbehandlung tatsächlich gelungen ist, eine auf den Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib resistente Nierenzellkarzinom-Zelllinie CAKI-2 zu etablieren.

Bis zum Ende der Langzeitkultur konnte sich die Zellzahl der permanent mit Sunitinib behandelten CAKI-2-Zellen nicht der der unbehandelten Kontrolle angleichen. Dieser Umstand ließ den Schluss zu, dass sich eine Resistenzentwicklung nicht allein anhand der Zellzahl erkennen lässt. Auch Gotink et al. konnten in ihrer Arbeit feststellen, dass die resistenten Tumorzellen (in diesem Falle 786-O) eine höhere Populationsverdopplungszeit aufwiesen als die nicht-resistenten, also langsamer wachsen [Gotink et al. 2011]. Die gleiche Erfahrung machten auch Huang und Kollegen, die die Endothel-Zelllinie HMEC-1 durch Langzeitbehandlung eine Resistenz gegenüber Sunitinib induzierten [Huang et al. 2014]. Bei einer Fortsetzung der Langzeitkultivierung wäre es womöglich gelungen, die Zellzahlen weiter einander anzunähern.

Auch bei Tumorzellen anderer Entitäten konnte im Laufe der Behandlung eine Resistenzentwicklung gegen Sunitinib beobachtet werden. Beispiele hierfür sind das hepatozelluläre Karzinom [Marijon et al. 2011], der gastrointestinale Stromatumor [Guo et al. 2009], das maligne Melanom [Bender, Ullrich 2012], das Plasmozytom [Shojaei et al. 2010] sowie das Schilddrüsenkarzinom [Piscazzi et al. 2012]

6.5 Sunitinib- Resistenz

In den vergangenen Jahren ist es gelungen, diverse potentielle Resistenzmechanismen des Nierenzellkarzinoms und anderer Tumorarten gegen Sunitinib und andere Tyrosinkinase-Inhibitoren zu identifizieren. Bergers und Hanahan unterschieden in ihrer Arbeit zwischen einer intrinsischen, also prä-existenten, sowie einer extrinsischen, d.h. erworbenen (adaptiven), Resistenz [Bergers, Hanahan 2008]. Diese Einteilung wird auch von anderen Autoren verwendet. Da die CAKI-2-Zellen in der vorliegenden Arbeit zunächst sensibel auf die Behandlung mit Sunitinib reagierten, ist hier von einer erworbenen (extrinsischen) Resistenz auszugehen.

6.5.1 Extrinsische Resistenz

Die lysosomale Sequestration von Sunitinib wurde von Gotink et al. als ein möglicher Resistenzmechanismus beschrieben, durch den die Tumorzelle ihr Überleben trotz Behandlung mit der Substanz sichern kann. Sie konnten feststellen, dass die intrazelluläre Konzentration von Sunitinib in resistenten Zellen sehr viel höher ist als in sensiblen. Durch Fluoreszenzmikroskopie wurde nachgewiesen, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor in Lysosomen angereichert wird. Somit kann der Zelle, trotz der hohen intrazellulären Sunitinib-Konzentration, kein Schaden durch die Substanz entstehen.

Singhal und Kollegen identifizierten RLIP76 (Ral-interagierendes Protein 76), ein Transmembran-Protein, das zur Ras-Familie gehört, als Schlüssel zu einem weiteren Resistenzmechanismus. Es gelang ihnen nicht nur nachzuweisen, dass das Protein in humanen Nierenzellkarzinom-Zellen (u.a. auch 786-O und CAKI-2) überexprimiert ist, sondern auch, dass eine Tumorzelle den Transporter dazu nutzen kann, Substanzen mittels aktivem Efflux aus dem Zellinneren hinaus zu befördern, um somit den toxischen Wirkungen zu entgehen [Singhal et al. 2010]. Auch Sunitinib kann so effektiv aus der Zelle hinausgeschleust werden. Dieser Mechanismus könnte auch der zugrundeliegende bei der Resistenzentwicklung der CAKI-2-Zellen dieser Arbeit sein.

Gao und Deng beschäftigten sich in ihrer Arbeit mit der Rolle von SK-1 (Sphingosin-Kinase 1) in der Resistenzentwicklung gegen Sunitinib bei Nierenkarzinom-Zelllinien

(786-O, A-498). SK-1 ist ein Enzym, das die Bildung von S1P (Sphingosin-1-Phosphat) katalysiert. S1P ist ein angiogenese-förderndes Sphingolipid. Es konnte bewiesen werden, dass in Sunitinib-resistenten Tumorzellen sowohl die Expression als auch die Aktivität von SK-1 erhöht sind, wodurch die Bildung einer Resistenz gegen den Tyrosinkinase-Inhibitor gefördert werden kann [Gao, Deng 2013]. Auch dieser mögliche Resistenzmechanismus könnte an den Sunitinib-resistenten CAKI-2-Zellen, die in dieser Arbeit generiert wurden, überprüft werden.

Neben diesen direkten Adaptationsmechanismen der Tumorzelle sind auch Resistenzmechanismen bekannt, die die Endothelzellen und das Tumor-Microenvironment betreffen.

Der sog. „Angiogenic switch“ bezeichnet eine Aktivierung alternativer Signalwege, die für Angiogenese verantwortlich sind. Huang et al. konnten feststellen, dass erhöhte Plasmaspiegel von Interleukin 8 (IL-8) zu einer schnelleren Resistenzentwicklung gegenüber dem Tyrosinkinase-Inhibitor führen. Tumoren, die eine hohe spontane IL-8-Ausschüttung aufwiesen, zeigten gar eine intrinsische Resistenz. Durch einen IL-8-neutralisierenden Antikörper konnte die Resistenzbildung abgeschwächt oder bereits resistente Zellen wieder auf Sunitinib sensibilisiert werden [Huang et al. 2010]. Der neutralisierende Effekt eines IL-8-Antikörpers konnte bereits beim Kolonkarzinom bewiesen werden [Mizukami et al. 2005]. Auch in der vorliegenden Arbeit hätte vor und während der Etablierung einer Resistenz die IL-8-Ausschüttung der Tumorzellen überprüft werden können. Durch einen IL-8-neutralisierenden Antikörper wäre es womöglich zu einer Verzögerung der Resistenzentwicklung gekommen.

Auch eine erhöhte Dichte von Perizyten in der Umgebung von Tumorgefäßen scheint zur Resistenzentwicklung beitragen zu können. Besteht in der Umgebung eines Tumorgefäßes ein dichtes Netz aus Perizyten, ist dieses Gefäß unempfindlicher gegenüber einer antiangiogenetischen Therapie. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass Perizyten selbst VEGF freisetzen und so zum Überleben von Tumor-Endothelzellen beitragen [Benjamin et al.1998].

6.5.2 Intrinsische Resistenz

Die Ursachen einer intrinsischen Resistenz gegen Sunitinib oder auch andere Tyrosinkinase-Inhibitoren sind bislang weitestgehend unklar. Eine Vermutung ist, dass es in den Tumorzellen, die eine vorbestehende Resistenz aufweisen, alternative proangiogenetische Signalwege existieren, die eine weitgehend vom VEGF-Signalweg unabhängige Angiogenese ermöglichen. Somit ist die gegen den VEGF-pathway gerichtete Therapie wirkungslos. Diese Theorie konnte bereits für das Mammakarzinom [Relf et al.1997] sowie für den pankreatischen Inselzelltumor [Casanovas et al. 2005] bestätigt werden. Auch myeloische Zellen, die proangiogenetische Faktoren sezernieren, werden für eine intrinsische Resistenz verantwortlich gemacht [Shojaei et al. 2007]. Besteht bei Patienten von Beginn an eine Resistenz gegen die Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, ist dies mit einer deutlich schlechteren Prognose vergesellschaftet [Busch et al. 2011].

6.5.3 Diskrepanz zwischen Forschung und klinischem Alltag

Die oben erläuterten Arbeiten zeigen, dass in den vergangenen Jahren sehr viele Erkenntnisse über mögliche Resistenzentwicklungen gewonnen werden konnten. Leider wurden diese meist im prä-klinischen Setting (in vitro oder am Tiermodell) gewonnen. Der Weg vom Labor zum Patienten ist aktuell also noch sehr weit. In Zukunft sollte daher versucht werden, die gewonnenen Erkenntnisse so auf die Klinik zu übertragen, dass diese einen konkreten Nutzen für die Behandlung von Patienten mit metastasierten Tumorleiden darstellen.

6.5.4 Umgang mit Resistenz im klinischen Alltag

Mittel der Wahl zur Vermeidung, Verzögerung oder Umgehung einer Resistenzentwicklung ist im klinischen Setting die Sequenztherapie. Die zugrunde liegenden Überlegungen sind, dass die verfügbaren Targeted-Therapeutika (sowohl Tyrosinkinase-Inhibitoren als auch mTOR-Inhibitoren) ein jeweils individuelles Spektrum an Rezeptoren und Signalwegen aufweisen, an denen sie binden und somit blockieren. So kann bei Resistenzentwicklung gegen ein Medikament (und damit verbundenem Tumorprogress) auf ein anderes Therapeutikum gewechselt werden und so durch Blockierung anderer Signalwege ein erneutes

Therapieansprechen erreicht werden. In den aktuellen Leitlinien findet sich eine große Auswahl an möglichen Sequenzfolgen für die Erst- und Zweitlinientherapie, abhängig vom Risikoprofil des Patienten [Pal, Vogelzang 2013], siehe auch Tabelle 7. Nach derzeitiger Datenlage scheint die Sequenzfolge Sunitinib-Axitinib-Everolimus die längerfristig erfolgversprechendste zu sein [Sun et al. 2013].

Ein weiterer Aspekt der Sequenztherapie beinhaltet die sog. „Sunitinib-Rechallenge“. Sie basiert auf der Erkenntnis, dass eine Resistenz gegenüber der Substanz nur transient, d.h. vorübergehender Natur, ist. Hammers et al. konnten feststellen, dass Hautmetastasen eines Patienten, der unter Behandlung mit Sunitinib einen Tumorprogress erlitten hatte, nach Exzision und Verpflanzung in eine athymische Maus wieder auf die Substanz ansprachen [Hammers et al. 2010]. Nach einem Tumorprogress unter Sunitinib kann auch in der klinischen Praxis durch Absetzen und Wechsel auf ein anderes Therapeutikum die Resistenz vorübergehend umgangen werden. Nach einer Sunitinib-Therapiepause kann bei Wiederansetzen des Tyrosinkinase-Inhibitors ein erneutes Ansprechen des Tumors erreicht werden [Porta et al. 2014]. Dabei scheint sich die Länge der Therapiepause auf die Ansprechrate der Re-Challenge auszuwirken. Patienten, bei denen vor erneuter Gabe von Sunitinib mehr als 6 Monate vergingen, zeigten ein längeres progressionsfreies Überleben als Patienten mit einer kürzeren Therapiepause [Zama et al. 2010].

Die Möglichkeit verschiedener Therapiesequenzen und das Phänomen der transienten Resistenz gegen Sunitinib sollte auch bei den in dieser Arbeit etablierten Sunitinib-resistenten CAKI-2-Zellen überprüft werden. Hierzu könnte sich an die Behandlung mit Sunitinib beispielsweise eine Episode anschließen, in der die Zellen entweder einem anderen Tyrosinkinase-Inhibitor (z.B. Pazopanib oder Axitinib) oder einem mTOR-Inhibitor (Temsilimus, Everolimus) ausgesetzt werden. Danach könnte durch eine erneute Sunitinib-Applikation überprüft werden, ob die zu vor vorhandene Resistenz noch vorhanden ist oder die Zellen erneut sensibel auf die Substanz reagieren. Alternativ kann eine transiente Sunitinib-Resistenz auch dadurch überprüft werden, dass über einen gewissen Zeitraum gar keine Behandlung der Zellen stattfindet und die Zellen erst nach Ablauf einer bestimmten Zeit wieder dem Tyrosinkinase-Inhibitor ausgesetzt werden.

Einen weiteren möglichen Ansatz beschreiben Dos Santos et al. in ihrer Publikation. Sie applizierten CAKI-1-Zellen in athymische Mäuse und behandelten diese bei Auftreten eines tastbaren Tumors wie folgt: eine Gruppe Mäuse erhielt eine Sunitinib-Monotherapie, eine zweite Gruppe eine Everolimus-Monotherapie. Die dritte Gruppe wurde im Wechsel eine bis drei Wochen mit Sunitinib und eine bis drei Wochen mit Everolimus behandelt. Es konnte festgestellt werden, dass bei der Gruppe mit der schnellen Sequenzfolge eine längere Zeit bis zur Tumorprogression verging als bei den Monotherapien [Dos Santos et al. 2015]. Eine Phase-II-Studie an 55 Patienten, die in 12-Wochen-Zyklen mit einem 4/2-Schema Sunitinib (Dosis: 50 mg täglich) im Wechsel mit einem 5/1-Schema Everolimus (Dosis: 10 mg täglich) bis zum Tumorprogress behandelt wurden, zeigte trotz vergleichbarer Toxizität keinen Therapievorteil zur bisher etablierten Therapiemethode [Davis et al. 2015].

Eine weitere Frage, die es zu beantworten gilt, ist, ob eine Kombination mehrerer Substanzen zu einer Potenzierung von deren zytotoxischer Wirkung führt. Fuereder et al. kombinierten Sunitinib und Everolimus zur Therapie des Magenkarzinoms. In vitro konnte keine verbesserte Wirkung der Kombination verglichen etwa mit einer Everolimus-Monotherapie festgestellt werden. Die mit der Kombinationstherapie behandelten Mäuse, denen zuvor Tumorzellen subkutan appliziert worden waren, reagierten jedoch mit einer kompletten Inhibierung des Tumorwachstums während die Monotherapien nur mit einer etwa 60-prozentigen Wachstumshemmung aufwarten konnten [Fuereder et al. 2010].

Die Kombinationstherapie verschiedener Substanzen zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist derzeit nicht im klinischen Alltag etabliert. Es wurden zwar verschiedene Phase-I-Studien mit den Kombinationen Sunitinib-Temsirolimus, Sunitinib-Everolimus oder Sunitinib-Interferon durchgeführt. Diese brachten aber gegenüber der Monotherapie keine Vorteile und wurden aufgrund der hohen Rate an Komplikationen, insbesondere toxische Nebenwirkungen, aufgegeben [Patel et al. 2009; Kroog et al. 2009; Motzer et al. 2009]. Einzig die Kombination von Sunitinib mit Bevacizumab konnte als Salvage-Therapie nach Tumorprogress unter Sunitinib ein gutes Therapieansprechen mit tolerablen Nebenwirkungen zeigen [Medioni et al. 2009].

6.5.5 Relevanz von Biomarkern

Die Entscheidung, welches Therapeutikum letztendlich ausgewählt wird, obliegt dem behandelnden Arzt. Zurzeit ist es aber leider nicht möglich, vor dem Beginn einer Behandlung mit einem bestimmten Therapeutikum eine Aussage zu treffen, ob ein Patient auf die Therapie sensibel reagiert oder ob bereits eine intrinsische Resistenz besteht. Auch während der Behandlung kann eine Resistenzentwicklung erst durch einen radiologisch festgestellten Tumorprogress bestätigt werden. Aus diesem Grund ist es essentiell, Biomarker im klinischen Alltag zu etablieren, die ein Therapieansprechen oder –versagen verlässlich anzeigen.

In den vergangenen Jahren gab es verschiedene potentielle Biomarker, die auf ihre klinische Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit untersucht wurden.

Garcia-Donas et al. untersuchten in einer prospektiven Kohorte Patienten unter Erstlinien-Therapie auf ihren VHL-Status. 64 Prozent der untersuchten Patienten wiesen eine VHL-Inaktivierung auf. Es bestand jedoch kein Unterschied im Therapieansprechen zwischen den Patienten mit physiologischem und pathologischem VHL-Status [Garcia-Donas et al. 2013]. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst eine Zelllinie zur Langzeitkultivierung ausgewählt, die einen physiologischen VHL-Genstatus aufweist. So sollte sichergestellt werden, dass dieser Aspekt in der Resistenzentwicklung der Nierenzellkarzinom-Zellen keine Rolle spielt.

DePrimo et al. untersuchten die Plasmalevel der löslichen zirkulierenden Tyrosinkinase-Rezeptoren sVEGFR-2 und sVEGFR-3 bei Patienten unter Sunitinib-Therapie, die an einem metastasiertem Nierenzellkarzinom litten. Sie fanden heraus, dass es zu einem Anstieg des Anteils dieser löslichen Rezeptoren während des ersten Therapie-Zyklus im Plasma kam. Zwei Wochen nach Beendigung der Behandlung hatte sich der Plasmaspiegel von sVEGFR-2 und -3 wieder normalisiert. Je höher dabei der Anstieg des Levels zu Therapiebeginn war, desto besser sprachen der Tumor auf die Behandlung an [DePrimo et al. 2007]. Die Freisetzung von den oben genannten löslichen Tyrosinkinase-Rezeptoren könnte auch während der Induktion von Resistenz an Tumorzellen in vitro getestet werden. Womöglich lässt sich dadurch schon zu Beginn einer Resistenzentwicklung je nach Höhe des

Plasmaspiegels der löslichen Rezeptoren voraussagen, wie schnell sich eine Resistenz in einer bestimmten Zelllinie manifestiert.

Alle bisher genannten potentiellen Biomarker stellen zwar vielversprechende Ansätze dar. Die oben beschriebenen Erkenntnisse wurden jedoch stets an kleinen, nicht-repräsentativen Patientenkollektiven gewonnen. Es sind also Studien an sehr viel größeren Populationen nötig, um die gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen. Aktuell gibt es also keinen Marker, der in der klinischen Praxis etabliert werden konnte.

Den aktuell wohl aussichtsreichen Ansatz stellt die Erforschung von microRNAs (kurz: miRNA) als potentielle Biomarker für Therapieansprechen und Prognose dar. Mi-RNAs sind kurze (ca. 22 Nukleotide umfassende) nicht-kodierende RNA-Transkripte, die eine wichtige Rolle in der Genregulierung spielen. Veränderte miRNA-Level können in vielen menschlichen Tumorarten nachgewiesen werden. Sie können sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor-Gen fungieren. Durch ihre hohe Stabilität lassen sich miRNAs sowohl im Gewebe als auch in Körperflüssigkeiten, z.B. Blut, nachweisen [Kong et al. 2012].

Nach Analyse von Plasmaproben von 44 Patienten, die als Erstlinientherapie Sunitinib erhielten, konnten Gamez-Pozo et al. eine Reihe von microRNAs definieren, die potentielle Marker für das Therapieansprechen darstellen [Gamez-Pozo et al. 2012].

In einer von Berkers und Kollegen verfassten Arbeit konnte die Herunterregulierung von miRNA-141 mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Sunitinib-Therapie in Zusammenhang gebracht werden [Berkers et al. 2013].

Prior und Kollegen konnten in ihrer Publikation weitere microRNAs identifizieren, die sowohl einen Einfluss auf das Therapieansprechen als auch auf die Prognose hatten. Hierfür wurden sowohl Gewebeproben von Patienten unter Sunitinib-Therapie als auch eine zuvor etablierte Sunitinib-resistente CAKI-2-Zelllinie untersucht. Im untersuchten Patientengewebe konnte festgestellt werden, dass die Hochregulation von miRNA-133a, miRNA-942 und miRNA-484 signifikant sowohl mit einem verkürzten progressionsfreien Intervall als auch mit einem verkürzten Gesamtüberleben vergesellschaftet war. Die Sunitinib-resistenten CAKI-2-Zellen wiesen ebenfalls eine Heraufregulierung der oben genannten drei microRNAs auf,

was in den Sunitinib-sensiblen Tumorzellen nicht nachgewiesen werden konnte [Prior et al. 2014].

Das microRNA-Profil einer Zelllinie scheint sich also im Laufe einer Resistenzentwicklung deutlich zu verändern. Daher wäre es für die zukünftige Etablierung von resistenten Karzinom-Zelllinien sinnvoll und wünschenswert, wenn während der Langzeitkultivierung zu bestimmten Zeitpunkten neben Viability- und Proliferationsassays auch RNA-Isolierungen durchgeführt wurden. Das micro-RNA-Profil bietet folglich eine weitere Möglichkeit, die Resistenzentwicklung zu verfolgen.

6.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine auf den Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib resistente Nierenzellkarzinom-Linie zu etablieren.

Bezugnehmend auf die Zielstellung dieser Arbeit lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Durch die Behandlung der vier Nierenzellkarzinom-Zelllinien 786-O, A-498, CAKI-1 und CAKI-2 mit verschiedenen Sunitinib-Konzentrationen zwischen 0,1 und 20 μM konnte für jede dieser Zelllinien ein individueller IC_{50} -Wert definiert werden. Zum Monitoring einer möglichen Resistenzentwicklung eignet sich neben den Viability Assays XTT und WST-1 am besten der Cell Proliferation ELISA (BrdU), da Sunitinib in den Tumorzellen am ehesten über eine Hemmung der Zellproliferation wirkt.
2. Es ist gelungen, durch permanente Behandlung der Zelllinie CAKI-2 mit Sunitinib in der Konzentration 5 μM über einen Zeitraum von 16 Wochen eine Resistenz der Tumorzellen gegen den Tyrosinkinase-Inhibitor zu induzieren.
3. Mithilfe der Viability Assays XTT bzw. WST-1 sowie dem Proliferationsassay Cell Proliferation ELISA (BrdU) konnte die allmähliche Resistenzentwicklung über den oben genannten Zeitraum erfasst werden. Dabei fiel zunächst eine Umgehung der Proliferationshemmung durch die permanent mit Sunitinib behandelten CAKI-2-Zellen auf. Erst später wiesen die dauerbehandelten Tumorzellen auch eine im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erhöhte Viability auf. Bis zum Ende der Langzeitkultivierung lag die Zellzahl der dauerbehandelten Zellen niedriger als die der Kontrollzellen.

Die Etablierung einer auf Sunitinib (oder auch andere Substanzen) resistenten Nierenzellkarzinom-Zelllinie stellt einen wichtigen Schritt in der Erforschung der Resistenzentwicklung gegen Targeted-Therapeutika dar. Der nächste notwendige Schritt nach Resistenzentwicklung liegt zum Einen darin, mögliche zugrundeliegende Mechanismen der Resistenz zu identifizieren. Zum Anderen ist es auch gerade im klinischen Alltag essentiell, Kenntnisse darüber zu erwerben, wie eine bestehende Resistenz umgangen werden kann. Daher sollten bei bestehender Resistenz gegen eine Substanz (zum Beispiel Sunitinib) die Tumorzellen in definierten Sequenzen mit anderen Substanzen behandelt werden. So kann überprüft werden, ob ein erneutes Therapieansprechen erreicht werden kann und ob nach einer Behandlungspause die Resistenz gegen das erste Therapeutikum revidiert werden kann. Die Suche nach der langfristig erfolgreichsten Sequenz kann wesentlich dadurch erleichtert werden, Biomarker zur Verfügung zu haben, die einen Therapieerfolg bzw. ein Therapieversagen zuverlässig anzeigen. Mit einem etablierten Biomarker kann dann die Überprüfung der am Zellkulturmodell gewonnen Erkenntnisse in komplexeren Modellen in Angriff genommen werden. Beispiele hierfür sind etwa die Kokultivierung von Nierenzellkarzinom-Zellen mit Endothelzellen und/oder tumorassoziierten Fibroblasten, um so ein exakteres Abbild eines „Tumor-Mikroenvironments“ zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit besteht in der dreidimensionalen Kultivierung verschiedener im Tumor-Mikroenvironment vertretender Zellen mittels Sphäroidtechnologie, die dann womöglich auch ins Tiermodell übertragen werden könnten.

7. Literaturverzeichnis

- Abe H, Kamai T (2013) Recent advances in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Int J Urol* 20: 944-955
- Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM (2003) SU11248 inhibits KIT and platelet derived growth factor receptor β in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2: 471-478
- Adams VR, Leggas M (2007) Sunitinib Malate for the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma and Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Thera* 29: 1338-1353
- Allory Y, Ouazana D, Boucher E, Thiounn N, Vieillefond A (2003) Papillary renal cell carcinoma: Prognostic value of morphological subtypes in a clinicopathologic study of 43 cases. *Virchows Arch* 442: 336-342
- Amato RJ (2000) Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 27: 177-86
- Bedke J, Buse S, Kurosch M, Haferkamp A, Jäger D, Hohenfellner M (2007) Paraneoplastische Syndrome des Nierenzellkarzinoms. *Urologe* 46: 45-48
- Bender C, Ullrich A (2012) PRKX, TTBK2 and RSK-4 expression causes Sunitinib resistance in kidney carcinoma- and melanoma- cell lines. *Int J Cancer* 131: E44-E55
- Benjamin LE, Hemo I, Keshet E (1998) A plasticity window for blood vessel remodeling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125: 1591-1598
- Berger DA, Megwalu II, Vlahiotis A, Radwan MH, Serrano MF, Humphrey PA, Piccirillo JF, Kibel AS (2008) Impact of comorbidity on overall survival in patients surgically treated for renal cell carcinoma. *Urology* 72: 359-363
- Bergers G, Hanahan D (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8(8): 592-603
- Berkers J, Govaere O, Wolter P, Beuselinck B, Schöffski P, van Kempen LC, Albersen M, Van den Oord J, Roskams T, Swinnen J, Joniau S, Van Poppel H, Lerut E (2013) A possible role for microRNA-141 down-regulation in Sunitinib resistant metastatic clear cell renal cell carcinoma through induction of epithelial-to-mesenchymal transition and hypoxia resistance. *J Urol* 189: 1930-1938
- Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski PJ, Henske EP (1996) Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *Am J Pathol* 149: 1201-1208
- Blom JHM, van Poppel H, Marechal JM, Jacqmin D, Schröder FH, de Prijck L, Sylvester R (2009) EORTC Genitourinary Tract Cancer Group. Radical nephrectomy with and without lymph node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trial 30881. *Eur Urol* 55: 28–34.

Britten CD, Kabbinavar F, Hecht JR, Bello C, Li J, Baum C, Slamon D (2008) A phase I and pharmacokinetic study of Sunitinib administered daily for 2 weeks, followed by a 1-week off period. *Cancer Chemother Pharmacol* 61(3): 515-524

Busch J, Seidel C, Weikert S, Wolff I, Kempkensteffen C, Weinkauff L, Hinz S, Magheli A, Miller K, Grünwald V (2011) Intrinsic resistance to tyrosine kinase inhibitors is associated with poor clinical outcome in metastatic renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 11: 295

Canter D, Kutikov A, Golovine K, Makhov P, Simhan J, Uzzo RG, Kolenko VM (2011) Are all multi-targeted Tyrosine kinase inhibitors created equal? An in vitro study of Sunitinib and Pazopanib in renal cell carcinoma cell lines. *Can J Urol* 18(4): 5819-5825

Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D (2005) Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors *Cancer Cell* 8: 299-309

Chaveau D, Duvic C, Chretien Y, Paraf F, Droz D, Melki P, Helenon O, Richard S, Grunfeld JP (1996) Renal involvement in Hippel- Lindau disease. *Kidney Int* 50: 944-951.

Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R (2009) Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum Pathol* 40: 10-29

Chevillat JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML (2003) Comparisons of outcome and prognostic factors among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 27: 612-624

Chow LQ, Eckardt SG (2007) Sunitinib: From Rational Design to Clinical Efficacy. *J Clin Oncol* 25: 884-896

Chow WH, Devesa SS (2008) Contemporary Epidemiology of Renal Cell Cancer *Cancer J* 14: 288-301

Christensen G (2007) A preclinical review of Sunitinib, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor with anti-angiogenic and antitumour activities. *Ann Oncol* 18 (Suppl 10) x3-x10

Coppin C, Porzolt F, Autenrieth M, Kumpf J, Coldman A, Wilt T (2005) Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*: CD001425

Davis ID, Long A, Yip S, Espinoza D, Thompson JF, Kichenadasse G, Harrison M, Lowenthal RM, Pavlakis N, Azad A, Kannourakis G, Steer C, Goldstein D, Shapiro J, Harvie R, Jovanovic L, Hudson AL, Nelson CC, Stockler MR, Martin A (2015) EVERSUN: a phase 2 trial of alternating Sunitinib and Everolimus as first-line therapy for advanced renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 26(6): 1118-1123

De Bouard S, Herlin P, Christensen JG, Lemoisson E, Gauduchon P, Raymond E, Guillemin JS (2007) Antiangiogenic and anti-invasive effects of Sunitinib on experimental human glioblastoma. *Neuro Oncol* 9(4): 412-423

Delahunt B, Eble JN (1997) Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol* 10: 537-544

Denton MD, Magee CC, Ovuworie C, Mauiyyedi S, Pascual M, Colvin RB, Cosimi AB, Tolkoff-Rubin N (2002) Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation. A pathologic review. *Kidney Int* 61: 2201-2209

De Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC, Klausner RD, Gnarr JR, Pause A, Lee S (2001) Role of transforming growth factor- α in von Hippel-Lindau (VHL)(-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1387-92

DePrimo SE, Bello CL, Smeraglia J, Baum CM, Spinella D, Rini BI, Michaelson MD, Motzer RJ (2007) Circulating protein biomarkers of pharmacodynamic activity of Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: modulation of VEGF and VEGF-related proteins. *J Transl Med* 5: 32

Dos Santos C, Tijeras-Raballand A, Serova M, Sebbagh S, Slimane K, Faivre S, de Gramont A, Raymond E (2015) Effects of preset sequential administrations of Sunitinib and Everolimus on tumour differentiation in Caki-1 renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 112: 86-94

Dudek AZ, Zolnieriek J, Dham A, Lindgren BR, Szczyluk C (2009) Sequential therapy with sorafenib and sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer* 115(1): 61-67

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I (2004) World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon, France: IARC Press International Agency for Research on Cancer

Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, Compton CA (2010) The American Joint Committee of Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol* 17: 1471-1474

Ellis LM, Hicklin DJ (2008) VEGF-targeted therapy: mechanisms of antitumor-activity. *Nature Reviews Cancer* 8: 579-591

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczyluk C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356: 125-134

Escudier B, Szczyluk C, Hutson TE, Demkow T, Staehler M, Rolland F, Negrier S, Laferriere N, Scheuring UJ, Cella D, Shah S, Bukowski RM (2009) Randomized phase II trial of first-line treatment with sorafenib versus interferon α -2a in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 27: 1280-1289

Escudier B, Gore M: Renal cell carcinoma: a handbook; Class Publishing 2010

Escudier B, Szczyluk C, Porta C, Gore M (2012) Treatment selection in metastatic renal cell carcinoma: expert consensus. *Nat Rev Clin Oncol* 9: 327-337

Escudier B, Eisen T, Porta C, Patard JJ, Khoo V, Algaba F, Mulders P, Kataya V (2012) Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up. *Annals of Oncology (Supplement 7)* vii67-vii71

Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, Bello C, Deprimo S, Brega N, Massimini G, Armand JP, Scigalla P, Raymond E (2006) Safety,

pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget Tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 24: 25-35

Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E (2007) Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature Reviews Drug Discovery* 6: 734-745

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676

Ferrara N, Kerbel RS (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438: 967-974

Ferlay J, Shin HR, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917

Fuereder T, Jaeger-Lansky A, Hoeflmayer D, Preusser M, Strommer S, Cejka D, Koehrer S, Crevenna R, Wackeck V (2010) mTOR inhibition by Everolimus counteracts VEGF induction by Sunitinib and improves anti-tumor activity against gastric cancer in vivo. *J Can Let* 296: 249-256

Fuhrman SA, Lasky L, Limas C (1982) Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 6:655-663

Gago-Dominguez M, Yuan J, Castela J, Ross R, Yu M (1999) Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 81:542-548

Gamez-Pozo A, Anton-Aparicio LM, Bayona C, Borrega P, Gallegos Sancho MI, Garcia-Dominguez R, de Portugal T, Ramos-Vazquez M, Perez-Carrion R, Bolos MV, Madero R, Sanchez-Navarro I, Fresno Vara JA, Espinosa Arranz E (2012) MicroRNA expression profiling of peripheral blood samples predicts resistance to first-line Sunitinib in advanced renal cell carcinoma patients. *Neoplasia* 14: 1144-1152

Gan HK, Seruga B, Knox JJ (2009) Sunitinib in solid tumors. *Expert Opin Investig Drugs* 18(6): 821-834

Gao H, Deng L (2014) Sphingosine Kinase-1 activation causes acquired resistance against Sunitinib in renal cell carcinoma cells. *Cell Biochem Biophys* 68: 419-425

Garcia-Donas J, Leandro-Garcia LJ, Gonzalez Del Alba A, Morente M, Alemany I, Esteban E, Arranz JA, Climent MA, Gallardo E, Castellano DE, Bellmunt J, Mellado B, Puente J, Moreno F, Font A, Hernando S, Robledo M, Rodriguez-Antona C (2013) Prospective study assessing hypoxia-related proteins as markers for the outcome of treatment with Sunitinib in advanced clear-cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 24: 2409-2414

George S, Blay JY, Casali PG, Le Cesne A, DePrimo SE, Harmon CS, Law CN, Tassell V, Baum CM, Demetri GD (2008) Continuous daily dosing (CDD) of Sunitinib (SU) in pts with advanced GIST: updated efficacy, safety, PK and pharmacodynamic analysis. *J Clin Oncol (meeting abstracts)* 26(15): 10554

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1417-1423

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, Lubensky I, Duan DR, Florence C, Pozzatti R, Walther MM, Bander NH, Grossman HB, Brauch H, Pomer S, Brooks JD, Isaacs WB, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM (1994) Mutations of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7: 85-90

Gnarra JR, Zou S, Merrill MJ, Wagner JR, Krumm A, Papavassiliou E, Oldfield EH, Klausner RD, Linehan WM (1996) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10589-94.

Gordon MS, Ebbinghaus SW (2008) Antiangiogenic Therapy for renal cell carcinoma. In: Teichner BA, Ellis LM (eds) *Antiangiogenic agents in cancer therapy*. Humana Press, New York, pp 427-439

Gotink KJ, Broxterman HJ, Labots M, de Haas RR, Dekker H, Honeywell RJ, Rudek MA, Beerepoot LV, Musters RJ, Jansen G, Griffioen AW, Assaraf YG, Pili R, Peters GJ, Verheul HMW (2011) Lysosomal Sequestration of Sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. *Clin Cancer Res* 17(23): 7337-7346

Guertin DA, Sabatini DM (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 11: 353-61

Guo T, Hajdu M, Agaram NP, Shinoda H, Veach D, Clarkson BD, Maki RG, Singer S, DeMatteo RP, Besmer P, Antonescu CR (2009) Mechanisms of Sunitinib resistance in gastrointestinal stromal tumor harboring KIT^{AY502-3ins} mutation: an in vitro mutagenesis screen for drug resistance. *Clin Cancer Res* 15 (22): 6862-6870

Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW, Charbonneau C (2008) Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review *Cancer Treat Rev* 34: 193-205

Hammers HJ, Verheul HM, Salumbides B, Sharma R, Rudek M, Jaspers J, Shah P, Ellis L, Shen L, Paesante S, Dykema K, Furge K, Teh BT, Netto G, Pili R (2010) Reversible epithelial to mesenchymal transition and acquired resistance to Sunitinib in patients with renal cell carcinoma: evidence from a xenograft study. *Mol Cancer Ther* 9: 1525-1535

Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during Tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70

Hasinoff BB, Patel D, O'Hara KA (2008) Mechanisms of myocyte cytotoxicity induced by the multiple receptor tyrosine kinase Sunitinib. *Mol Pharmacol* 74: 1722-1728

Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarra JR, Linehan WM (1994) Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA-Methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9700-9704

Hu J, La Vecchia C, DesMeules M, Negri E, Mery L (2008) Nutrient and fiber intake and risk of renal cell carcinoma. *Nutr Cancer* 60: 720-728

Huang D, Ding Y, Li Y, Luo WM, Zhang ZF, Snider J, VandenBelt K, Qian CN, Teh BT (2010) Sunitinib acts primarily on tumor endothelium rather than tumor cells to inhibit the growth of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 70(3): 1053-1062

Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN, Kahnoski R, Futreal PA, Furge KA, The BT (2010) Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent Sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 70(3): 1063-1071

Huang L, Hu C, Di Benedetto M, Varin R, Liu J, Wang L, Vannier JP, Jin J, Janin A, Lu H, Li H (2014) Induction of multiple drug resistance in HMEC-I endothelial cells after long-term exposure to Sunitinib. *Onco Targets and Therapy* 7: 2249-2255

Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf I, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ (2007) Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356: 2271-2281

Hutson TE, Figlin RA, Kuhn JG, Motzer RJ (2008) Targeted therapies for metastatic renal cell carcinoma: an overview of toxicity and dosing strategies. *The Oncologist* 13: 1084-1096

Huynh H, Ngo VC, Choo SP, Poon D, Koong HN, Thng CH, Toh HC, Zheng L, Ong LC, Jin Y, Song IC, Chang AP, Ong HS, Chung AY, Chow PK, Soo KC (2009) Sunitinib (SUTENT, SU11248) suppresses tumor growth and induces apoptosis in xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *Current Cancer Drug Targets* 9(6): 738-747

Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Yang Y, Komatsu N, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H (2006) The antitumor effects of Sunitinib (former SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Cancer Ther* 5: 2522-2530

Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin Jr WG (1995) Tumor suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature Medicine* 1: 822-826

Jiang BH, Liu LZ (2008) Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat* 11: 63-76

Kirkali Z, Algaba F, Scarpelli M, Trias I, Selvaggi FP, van Poppel H (2007) What does the urologist expect from the pathologist (and what can the pathologist give) in reporting on adult kidney tumour specimens? *Eur Urol* 51: 1194-1201

Kondo K, Kico J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin W (2002) Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 1: 237-246

Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M (2012) MicroRNAs in cancer management. *Lancet Oncol* 13: e249-e258

Kroog GS, Feldman DR, Kondagunta GV, Ginsberg MS, Fischer PM, Trinos MJ (2009) Phase I trial of RAD001 (Everolimus) plus Sunitinib in patients metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 27 (Suppl): 15 s (abstract)

Kuroda M, Toi M, Hiroi M, Enzan H (2003) Review of chromophobe renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol* 18: 165-171

Lane BR, Tiong HY, Campbell SC, Fergany AF, Weight CJ, Larson BT, Novick AC, Flechner SM (2009) Management of the adrenal gland during partial nephrectomy. *J Urol* 181:2430-2437

Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260: 1317-1320

Le Tourneau C, Faivre S, Serova M, Raymond E (2008) mTORC1 inhibitors: is Temsirolimus in renal cancer telling us how they really work? *Br J Cancer* 99: 1197-1203

Lindl T, Gstraunthaler G: Zell- und Gewebekultur – Von den Grundlagen bis zur Laborbank-, 6. Auflage 2008; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

Linehan WM, Vasselli J, Srinivasan R, Walther MM, Merino M, Choyke P, Vocke C, Schmidt L, Isaacs JS, Glenn G, Toro J, Zbar B, Bottaro D, Neckers L (2004) Genetic Basis of Cancer in the Kidney: Disease-Specific Approaches to Therapy. *Clin Cancer Research* 10: 6282-6289

Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Patard JJ, Mulders P, Sinescu IC (2010) EAU Guidelines on Renal Cell carcinoma: the 2010 Update. *Eur Urol* 58: 398-406

Ljungberg B, Campbell SC, Cho HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, Kiemeny LA (2011) The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology* 60: 615-621

Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z (2006) 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol* 49: 798-805

Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R (2009) 2009 update on the classification of renal tumors in adults. *Int J Urol* 16: 432-443

Lyros O, Mueller A, Heide F, Schimanski CC, Gockel I, Galle PR, Lang H, Moehler M (2010) Analysis of anti-proliferative and chemosensitizing effects of Sunitinib on human esophagogastric cancer cells: synergistic interaction with Vandetanib via inhibition of multi-receptor tyrosine kinase pathways. *Int J Cancer* 127: 1198-1208

Makhov PB, Golovine K, Kutikov A, Teper E, Canter DJ, Simhan J, Uzzo RG, Kolenko VM (2012) Modulation of Akt/mTOR signaling overcomes Sunitinib resistance in renal and prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 11: 1510-1517

Mandel JS, McLaughlin JK, Schlehofer B, Møller H, Helmer U, Lindblad P, McCredie M, Adami HO (1995) International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int J Cancer* 61: 601-605

Marijon H, Dokmak S, Paradis V, Zappa M, Bieche I, Bouattour M, Raymond E, Faivre S (2011) Epithelial-to-mesenchymal transition and acquired resistance to Sunitinib in a patient with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 54: 1073-1078

McLaughlin JK, Lindblad P, Møller A, McCredie M, Mandel JS, Schlehofer B, Pommer W, Adami HO (1995) International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. *Int J Cancer* 60: 194-198

Medioni J, Banu E, Helley D, Scotte F, Fournier L, Mejean A, Chedid A, Azizi M, Andrieu JM, Oudard S (2009) Salvage therapy with Bevacizumab-Sunitinib combination after failure of Sunitinib alone for metastatic renal cell carcinoma: a case series. *Eur Urol* 56: 207-211

Møller A, Lindblad P, Schlehofer B, Bergström R, Mandel JS, McCredie M, McLaughlin JK, Niwa S, Odaka N, Pommer W, Olsen JH (1995) International renal-cell cancer study. III. Role of weight, height, physical activity, and use of amphetamines. *Int J Cancer* 60: 350-354

Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JÖ, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM (2003) In Vivo Antitumor Activity of SU11248, a Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Targeting Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-derived Growth Factor Receptors: Determination of a Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship. *Clin Can Res* 9: 327-337

Miyake M, Anai S, Fujimoto K, Ohnishi S, Kuwada M, Nakai Y, Inoue T, Tomioka A, Tanaka N, Hirao Y (2012) 5-fluorouracil enhances the antitumor effect of Sorafenib and Sunitinib in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Oncology Letters* 3: 1195-1202

Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Zukerberg LR, Kohgo Y, Lynch MP, Rueda BR, Chung DC (2005) Induction of Interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1 α -deficient colon cancer cells. *Nat Med* 11: 992-997

Morais C (2014) Sunitinib resistance in renal cell carcinoma. *JKCVHL* 1(1): 1-11

Motzer RJ, Bander, NH, Nanus, DM. (1996) Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 335: 865-875.

Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara, J (1999) Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 17: 2530-2540.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA (2007) Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell-carcinoma. *N Engl J Med* 356: 115-124

Motzer RJ, Hudes G, Wilding G, Schwartz LH, Hariharan S, Kempin S, Fayyad R, Figlin RA (2009) Phase I trial of Sunitinib malate plus interferon-alpha for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 7: 28-33

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA, Garcia-del-Muro X, Sosman JA, Solska E, Wilding G, Thompson JA, Kim ST, Chen I, Huang X, Figlin RA (2009) Overall Survival and Updated Results for Sunitinib compared with Interferon alfa in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 27: 3584-3590

National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Kidney Cancer 2009

http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp

Negri E, Foschi R, Talamini R, Montella M, Ramazzotti V, Dal Maso L, Bosetti C, Franceschi S, Zucchetto A, La Vecchia C (2006) Family history and risk of renal cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 2441-2444.

Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C, Ravaud A, Mercatello A, Peny J, Mousseau M, Philip T, Tursz T (1998) Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Français d'Immunotherapie. N Engl J Med* 338: 1272-1278

Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Mukeria A, Holcatova I, Schmidt L, Toro JR, Karami S, Hung R, Gerard GF, Linehan WM, Merino M, Zbar B, Boffetta B, Brennan P, Rothman N, Chow WH, Waldman FM, Moore LE (2008) Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 14: 4726-4734

Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Takeshita A, Taniguchi A, Komatsu N, Togitani K, Koeffler HP, Yokoyama A (2008) Blockade of MEK/ERK signaling enhances Sunitinib-induced growth inhibition and apoptosis of leukemia cells possessing activating mutations of the FLT3 gene. *Leu Res* 32: 865-872

Oberneder R, Wagner H, Siebels M, Stieber P, Busch M, Weiss M. *Nierenzellkarzinom. B. Liedl [Hrsg.] (2003) Manual urogenitale Tumoren. 3. Edition. München, Wien. New York, W: Zuckerschwerdt, S.79-97*

Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin Jr WG, Iliopoulos O (1998) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Molecular Cell* 1: 959-968

Pal SK, Vogelzang NJ (2013) Sequential treatment strategies and combination therapy regimens in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Adv Hematol Oncol* 11(3): 146-155

Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guillé F, Lobel B (2003) Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 44: 226-232

Patel PH, Senico PL, Curiel RE, Motzer RJ (2009) Phase I study combining treatment with Temsirolimus and Sunitinib malate in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 7: 24-27

Piscazzi A, Costantino E, Maddalena F, Natalicchio MI, Gerardi AM, Antonetti R, Cignarelli M, Landriscina M (2012) Activation of the RAS/RAF/ERK signaling pathway contributes to resistance to Sunitinib in thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 97(6): E898-E906

Porena M, Vespasiani G, Rosi P, Costantini E, Virgili G, Mearini E, Micali F (1992) Incidentally detected renal cell carcinoma: role of ultrasonography. *J Clin Ultrasound* 20: 395-400

Porta C, Sabbatini R, Procopio G, Paglino C, Galligioni E, Ortega C (2012) Primary resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced renal cell carcinoma: state-of-the-science. *Expert Rev Anticancer Ther* 12: 1571-1577

Porta C, Paglino C, Grünwald V (2014) Sunitinib re-challenge in advanced renal-cell carcinoma. *Br J Cancer* 111: 1047-1053

Prenen H, Cools J, Mentens N, Folens C, Sciot R, Schöffski P, van Oosterom A, Marynen P, Debiec-Rychter M (2006) Efficacy of the kinase inhibitor SU11248 against gastrointestinal stromal tumor mutants refractory to Imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 12: 2622-2627

Presta LG, Chen H, O' Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N (1997) Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57: 4593-99

Prior C, Perez-Gracia JL, Garcia-Donas J, Rodriguez-Antona C, Guruceaga E, Esteban E, Suarez C, Castellano D, del Alba AG, Lozano MD, Carles J, Climent MA, Arranz JA, Gallardo E, Puente J, Bellmunt J, Gorpide A, Lopez-Picazo JM, Hernandez AG, Mellado B, Martinez E, Moreno F, Font A, Calvo A (2014) Identification of tissue microRNAs predictive of Sunitinib activity in patients with metastatic renal cell carcinoma. *PLOS one* 9(1): e86263

Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL (1997) Expression of the angiogenic factors Vascular Endothelial Cell Growth Factor, Acidic and Basic Fibroblast Growth Factor, Tumor Growth Factor β -1, Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor, Placenta Growth Factor, and Pleiotrophin in Human Primary Breast Cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 57: 963

Rini BI, Tamaskar I, Shaheen P, Salas R, Garcia J, Wood L, Reddy S, Dreicer R, Bukowski RM (2007) Hypothyroidism in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with Sunitinib. *J Natl Cancer Inst* 99: 81-83

Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, Stadler WM, Vaena DA, Ou SS, Archer L, Atkins JN, Picus J, Czaykowski P, Dutcher J, Small EJ (2008) Bevacizumab plus Interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *J Clin Oncol* 26: 5422-5428

Rini BI, Atkins MB (2009) Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 10: 992-1000

Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, Stadler WM, Vaena DA, Archer L, Atkins JN, Picus J, Czaykowski P, Dutcher J, Small EJ (2010) Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206. *J Clin Oncol* 28: 2137-2143

Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010 9. Ausgabe Berlin

Roche Diagnostics: Cell Death Detection Elisa Plus Instruction Manual, Version 14 (November 2013)

Roche Diagnostics: Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Instruction Manual, Version 16 (Januar 2013)

Roche Diagnostics: Cell Proliferation Kit II (XTT), Instruction Manual, Version 17 (Februar 2011)

Roche Diagnostics: Cell Proliferation Reagent WST-1, Instruction Manual, Version 16 (Februar 2011)

Roche Diagnostics: Cytotoxicity Detection Kit (LDH) Instruction Manual, Version 10 (Mai 2012)

Sabatini DM (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 6: 729-734

Sakai I, Miyake H, Fujisawa M (2013) Acquired resistance to Sunitinib in human renal cell carcinoma cells is mediated by constitutive activation of signal transduction pathways associated with tumor cell proliferation. *BJU international* 112: E211-E220

Santoni M, Amantini C, Morelli MB, Liberati S, Farfariello V, Nabissi M, Bonfili L, Eleuteri AM, Mozzicafreddo M, Burattini L, Berardi R, Cascinu S, Santoni G (2013) Pazopanib and Sunitinib trigger autophagic and non-autophagic death of bladder tumor cells. *Br J Cancer* 109: 1040-1050

Schenck M, Muegge LO. "Targeted therapy" beim metastasierten Nierenzellkarzinom. *Der Onkologe* 2010; 16: 157-167

Schlehofer B, Pommer W, Møller A et al. International renal-cell cancer study. VI. The role of medical and family history. *Int J Cancer* 1996; 66: 723-726

Schmelz HU, Sparwasser C, Weidner W (2014) *Facharztwissen Urologie*, 3. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York

Seandel M, Shia J, Linkov I, Maki RG, Antonescu CR, Dupont J (2006) The activity of Sunitinib against Gastrointestinal Stromal Tumor seems to be distinct of its antiangiogenic effects. *Clin Cancer Res* 12: 6203-6204

Shapiro JA, Williams MA, Weiss NS (1999) Body mass index and risk of renal cell carcinoma. *Epidemiology* 10: 188-191

Shen SS, Truong LD, Ayala AG, Ro JY (2007) Recently described and emphasized entities of renal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 131: 1234-1243

Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber HP, Ferrara N (2007) Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b⁺ and Gr 1⁺ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 25: 911-920

Shojaei F, Lee JH, Simmons BH, Wong A, Esparza CO, Plumlee PA, Feng J, Stewart AE, Hu-Lowe DD, Christensen JG (2010) HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in Sunitinib-resistant tumors. *Cancer Res* 70(24): 10090-10100

Singhal SS, Sehrawat A, Sahu M, Singhal P, Vatsyayan R, Rao Lensani PC, Yadav S, Awasthi S (2010) Rlip 76 transports sunitinib and sorafenib and mediates drug resistance in kidney cancer. *Int J Cancer* 126: 1327-1338

Sonpavde G, Jian W, Liu H, Wu MF, Shen SS, Lerner SP (2009) Sunitinib malate is active against human urothelial carcinoma and enhances the activity of cisplatin

in a preclinical model. *Urol Oncol: Seminars and Original Investigations* 27: 391-399

Stacchiotti S, Negri T, Zaffaroni N, Palassini E, Morosi C, Brich S, Conca E, Bozzi F, Cassinelli G, Gronchi A, Casali PG, Pilotti S (2011) Sunitinib in alveolar soft part carcinoma: evidence of a direct antitumor effect. *Annals of Oncology* 22: 1682-1690

Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, Barrios CH, Salman P, Gladkov OA, Kavina A, Zarba JJ, Chen M, McCann L, Pandite L, Roychowdhury DF, Hawkins RE (2010) Pazopanib in local advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 28: 1061-1068

Störkel S (1999) Epitheliale Tumoren der Niere- Pathologische Subtypisierung und zytogenetische Korrelation. *Der Urologe* 38: 425-432

Sun J, Sun Q, Brown MF, Dudgeon C, Chandler J, Xu X, Shu Y, Zhang L, Yu J (2012) The multi-targeted kinase inhibitor Sunitinib induces apoptosis in colon cancer cells via PUMA. *PLoS One* 7(8): e43158

Sun M, Shariat SF, Trinh QD, Meskawi M, Bianchi M, Hansen J, Abdollah F, Perrotte P, Karakiewicz PI (2013) An evidence-based guide to the selection of sequential therapies in metastatic renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol* 5: 121-128
Sutent ® Pfizer U.S Physician Prescribing Information.

<http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=607> (Juni 2015)

Van der Poel HG, Roukema JA, Horenblas S, van Geel AN, Debruyne FM (1999) Metastasectomy in renal cell carcinoma: a multicenter retrospective analysis. *Eur Urol* 35: 197-203

Verine J, Pluvinage A, Bousquet G, Lehmann-Che J, de Bazelaire C, Soufir N, Mongiat-Artus P (2010) Hereditary renal cell cancer syndromes: An update of a systematic review. *Eur Urol* 58: 701-710

Vogelzang NJ, Stadler, WM (1998) Kidney cancer. *Lancet* 352: 1691-1696

Westenfelder C, Baranowski RL (2000) Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney International* 58: 647-657

Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE (1978) In vitro cultivation of human renal cell cancer. *In Vitro* 14: 779-786

Wotkowicz C, Wszolek MF, Libertino JA (2008) Resection of renal tumors invading the vena cava. *Urol Clin North Am* 35: 657-671

Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H (2009) Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* 69 (6): 2506-2513

Yang F, Jove V, Xin H, Hedvat M, Van Meter TE, Yu H (2010) Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways. *Mol Cancer Res* 8(1): 35-45

Zama IN, Hutson TE, Elson P, Cleary JM, Choueiri TK, Heng DY, Ramaiya N, Michaelson MD, Garcia JA, Knox JJ, Escudier B, Rini BI (2010) Sunitinib rechallenge in metastatic renal cell carcinoma patients. *Cancer* 116: 5400-5406

8. Publikationsverzeichnis

Posterpräsentationen und Vorträge

64. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 26.-29. September 2012, Leipzig „Establishment of a Sunitinib resistant cell line from ccRCC by long term treatment“ (Simone Krein, Anne Weiland, Jörn Kamradt, Michael Stöckle, Kerstin Junker, Gerhard Unteregger)

20th Meeting of the EAU Section of Urological Research (ESUR), 25.-27. Oktober 2012, Strasbourg „Identification of specific miRNA expression patterns related to resistance in Sunitinib-treated renal cell cancer cell lines“ (Anne Weiland, Simone Krein, Joana Heinzelmann, Jörn Kamradt, Michael Stöckle, Kerstin Junker, Gerhard Unteregger)

4. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 08.-10. November 2012, Berlin „Establishment of a Sunitinib resistant cell line from ccRCC by long term treatment“ (Simone Krein, Anne Weiland, Jörn Kamradt, Michael Stöckle, Kerstin Junker, Gerhard Unteregger)

104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 06.-10. April 2013, Washington, D.C. „Establishment of a Sunitinib resistant cell line from ccRCC by long term drug application“ (Gerhard Unteregger, Simone Krein, Anne Weiland, Michael Stöckle, Kerstin Junker)

54. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie, 13.-15. Juni 2013, Baden-Baden „Sunitinib-resistente Zelllinien des Nierenzellkarzinoms nach Langzeittherapie“ (Simone Krein, Anne Weiland, Carsten Ohlmann, Michael Stöckle, Gerhard Unteregger, Kerstin Junker)

65. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 25.-28. September 2013, Dresden „Charakteristische Veränderungen im microRNA-Profil bei der Resistenzentwicklung in Zellkulturen des Nierenzellkarzinoms nach Langzeitbehandlung mit Sunitinib“ (Gerhard Unteregger, Daria Schendel, Joana Heinzelmann, Simone Ernst, Anne Weiland, Michael Stöckle, Kerstin Junker)

105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 05.-09. April 2014, San Diego „Sunitinib-resistant ccRCC cell lines subjected to TKI/m-TOR-inhibitors as a model for sequence therapy“ (Gerhard Unteregger, Daria Schendel, Joana Heinzelmann, Anne Weiland, Simone Ernst, Michael Stöckle, Kerstin Junker)

Danksagung

An dieser Stelle ist es mir ein Anliegen, all denjenigen Personen meinen Dank auszusprechen, die mit Ihrer Unterstützung entscheidend zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Zu allererst möchte ich mich sehr herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Kerstin Junker bedanken, die mir vor allem während der Abfassung der Dissertationsschrift immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich so betreut hat, wie man es sich als Doktorand nur wünschen kann.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Unteregger bin ich für die Betreuung während der experimentellen Phase der Doktorarbeit zu Dank verpflichtet.

Dr. rer. nat. Joana Heinzelmann möchte ich dafür danken, dass sie mir als wertvolle Ansprechpartnerin immer zur Seite stand.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Helga Angeli, Eva Bonnert, Maria Link und Dr. rer. nat. Volker Jung. Sie haben mir nicht nur die zur Durchführung der Versuche notwendigen Zellkulturtechniken mit viel Geduld und Sorgfalt beigebracht, sondern waren auch jederzeit ansprechbar, wenn ich irgendetwas brauchte. Nicht zuletzt hatten sie immer ein offenes Ohr und ein tröstendes und aufmunterndes Wort, wenn es nicht so lief wie geplant.

Ich danke meinem Kommilitonen und guten Freund Johannes Schmidt für das gemeinsame Durchhalten während der letzten vier Jahre. Ohne die gegenseitigen Motivationen und viel Humor wäre diese Zeit definitiv nicht so gut auszuhalten gewesen.

Meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mir gezeigt haben, dass es auch noch ein Leben außerhalb von Krankenhaus und Labor gibt.

Weiterhin gilt mein Dank natürlich meinen Eltern, die mich mit ihrer Unterstützung und Fürsorge schon mein Leben lang begleiten. Ohne ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre Liebe wären dieses Studium und die Promotion niemals möglich gewesen.

Ich danke meinem Mann Matthias dafür, dass er mir bei allen Herausforderungen des Lebens zur Seite steht und immer mein Fels in der Brandung ist.

